



Méthodes d'illumination et de détection innovantes pour l'amélioration du contraste et de la résolution en imagerie moléculaire de fluorescence en rétrodiffusion

Frédéric Fantoni

► To cite this version:

Frédéric Fantoni. Méthodes d'illumination et de détection innovantes pour l'amélioration du contraste et de la résolution en imagerie moléculaire de fluorescence en rétrodiffusion. Sciences de la Terre. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENU034 . tel-01107612v2

HAL Id: tel-01107612

<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01107612v2>

Submitted on 19 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Sciences de la Terre, Univers, Environnement

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Frédéric FANTONI

Thèse dirigée par **Jérôme I. MARS**

préparée au sein du

laboratoire Grenoble, Image, Parole, Signal, Automatique (Gipsa-lab) et du

Laboratoire Imagerie et Systèmes d'Acquisition - CEA-LETI
dans l'école doctorale Terre Univers Environnement (TUE)

Méthodes d'illumination et de détection innovantes pour l'amélioration du contraste et de la résolution en imagerie moléculaire de fluorescence en rétrodiffusion

Thèse soutenue publiquement le **5 Décembre 2014**,
devant le jury composé de :

M. Pierre-Olivier AMBLARD, Président

DR, CNRS, Grenoble

M. Patrick POULET, Rapporteur

PH-HDR, ICube, Université de Strasbourg

Mme Geneviève BOURG-HECKLY, Rapporteur

MCF-HDR, Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie

M. Jean-Luc COLL, Examineur

DR, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier

M. Bruno MONTCEL, Examineur

MCU, CREATIS, Université de Lyon

M. Sylvain GIOUX, Examineur

DR, Center for Molecular Imaging, Harvard Medical School

M. Jérôme I. MARS, Directeur de thèse

PR., Gipsa-lab, Grenoble INP

M. Lionel HERVE, Encadrant

Chercheur-HDR, LISA, CEA-LETI



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
ÉCOLE DOCTORALE TUE
Terre Univers Environnement

T H È S E

pour obtenir le titre de

docteur en sciences

de l'Université de Grenoble

Mention : SCIENCES DE LA TERRE, UNIVERS, ENVIRONNEMENT

Présentée et soutenue par

Frédéric FANTONI

**Méthodes d'illumination et de détection innovantes pour
l'amélioration du contraste et de la résolution en imagerie
moléculaire de fluorescence en rétrodiffusion**

Thèse dirigée par Jérôme I. MARS préparée au laboratoire Grenoble,
Image, Parole, Signal, Automatique (Gipsa-lab) et au Laboratoire
Imagerie et Systèmes d'Acquisition - CEA-LETI

soutenue le 5 Décembre 2014

Jury :

| | |
|----------------------------|--|
| M. Pierre-Olivier AMBLARD | - CNRS, Grenoble |
| M. Patrick POULET | - ICube, Université de Strasbourg |
| Mme Geneviève BOURG-HECKLY | - Laboratoire Jean Perrin, UPMC |
| M. Jean-Luc COLL | - Institut Albert Bonniot, UJF |
| M. Bruno MONTCEL | - CREATIS, Université de Lyon |
| M. Sylvain GIOUX | - Center for Molecular Imaging, Harvard Medical School |
| M. Jérôme I. MARS | - Gipsa-lab, Grenoble INP |
| M. Lionel HERVE | - LISA, CEA-LETI |

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Geneviève Bourg-Heckly et M. Patrick Poulet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse et de mi-thèse, leur avis et leur esprit critique m'aura permis de terminer ma thèse de la meilleure façon possible. Merci aussi à M. Bruno Montcel et M. Jean-Luc Coll pour l'intérêt qu'ils auront porté à ces travaux. Un merci plus particulier à M. Pierre-Olivier Amblard qui aura eu l'amabilité d'accepter d'être président de mon jury malgré le délai très court que nous lui avons imposé.

Merci ensuite à mes encadrants. Jérôme, merci pour ta disponibilité, ton enthousiasme, et ton recul par rapport à la problématique qui nous a permis de ne pas nous perdre en chemin. Merci surtout de m'avoir accepté pour cette thèse même si, comme tu me l'avais dit lors de notre premier entretien, je ne pouvais que te décevoir après la thèse d'Anne-Sophie (mais je pense avoir réussi à lui faire honneur !). Lionel, merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter durant cette thèse, aussi bien au travail qu'en dehors (je n'aurais pas pu aller à San Francisco la première fois, et j'y serais resté coincé la seconde fois sans toi si tu n'avais pas été là). Merci pour toutes nos discussions, qu'elles aient été à propos de la façon de résoudre l'équation de l'approximation de la diffusion en milieu homogène semi-infini ou bien à propos de la façon dont les fantômes se déplacent dans Pacman. Enfin, merci Sylvain, même si tu n'as pu avoir qu'un regard lointain sur mon travail, tu as toujours su avoir les mots qu'il fallait pour me motiver. J'espère qu'on se reverra un jour à ton retour en France !

Merci au laboratoire LISA. Jean-Marc tout d'abord, pour avoir accepté ma candidature à cette thèse et pour son suivi lors de ces trois années. Merci Vincent, même si je ne t'aurais quasiment pas vu pendant ma thèse, c'est quand même grâce à toi si je me suis lancé, et, comme Sylvain, tu trouves toujours les mots qu'il faut pour donner l'impression aux gens qu'ils ont de l'or entre les doigts. Merci Cédric, moi aussi un jour j'aimerais dire "vous avez 40 ans de science devant vous" tout en continuant à faire des trucs cools comme aller voir un concert des Black Keys ou bien monter sur une table en hurlant "SILENCE !". Merci Thomas pour ta bonne humeur communicative et ton coaching sans faille aux tournois de foot. Merci Michel pour ta disponibilité et ta patience face à toutes mes questions plus stupides les unes que les autres. Merci à Mathieu D. et Mathieu D., comme Michel vous avez toujours été là pour moi, je regrette juste que vous soyez partis si tôt. Merci Jean-Gui, en espérant que tu te plaisais au DOPT. Merci Chacha et Bland' pour tous les moments passés ensemble, les pauses et les repas me manquent, et j'envisage même de me mettre à la couture ! Merci aux autres membres du LISA que je n'ai pas cités pour votre bonne humeur et votre humour. Je l'ai déjà dit et je le répète, je n'aurai pas pu imaginer un meilleur environnement pour mes premières expériences professionnelles. Merci aussi aux "anciens" du LISA, Aneso, Agathe, François et Delphine, vous me manquez et les jeudi bars ne sont plus pareils sans vous.

Merci aussi aux "gens cools du SBSC". Merci de m'avoir accepté parmi vous au moment où les gens du LISA ont commencé à se sentir vieux. Merci Raph tout d'abord puisque c'était toi historiquement qui a lancé le rapprochement de nos labos. Merci Jon d'avoir poursuivi le rapprochement, peut-être qu'un jour on arrivera à avoir l'octave qui nous manque pour

"lovin' you"! Merci Fabien pour ta bonne humeur permanente, même si je reste jaloux de tes cheveux. Merci Thomas, j'aurais voulu écrire autre chose mais je ne suis pas certain que ce genre de termes aient leurs places dans ces pages (une piste : comme le disait Maître Capello, c'est un anagramme de Lucerne). Merci Marco pour toutes tes anecdotes de camp de vacances. Merci Mathilde, pour tous les fous-rires qu'on a eu ensemble (comme je te le disais, je suis maintenant obligé d'attendre le jeudi pour avoir ma dose) et les pauses qu'on a faites quand j'étais dans les couloirs pendant ma rédaction. Merci Jess pour les pauses au bureau de Jon et ta bonne humeur qui n'a d'égal que ta ronchontitude (si si, ce mot existe). Merci de t'être décarcassée pour tous nos cadeaux de fin de thèse. Merci Lisa et Claire pour toutes les pauses et toutes les soirées. Je vais devenir incollable en films de filles et en chansons de Céline Dion.

Merci Antho (je ne t'ai pas mis dans la liste du LISA vu que tu n'y es plus et que tu mérites ton petit paragraphe propre). J'aimerais potentiellement écrire un truc classe, mais c'est typiquement le genre de choses que je n'arrive pas à faire. Donc je vais juste dire merci d'avoir été super cool quand tu étais en stage, merci d'être revenu au CEA, et merci d'être toujours aussi cool maintenant.

Sur un plan moins professionnel, merci aux membres de Jaga et de St Barth, la musique est le défouloir parfait en période de rédaction, et faire du bruit avec vous aura été un régal!

A ce stade des remerciements, je pense qu'une des seules personnes qui les liront est en train de se dire "mais quel vilain !" parce qu'elle n'a toujours pas vu apparaître son nom. Merci Alice. Je n'arriverai pas à écrire à quel point j'ai de la chance de t'avoir connu, et, comme pour Antho, à quel point je suis heureux de te compter parmi mes meilleurs amis. Merci pour tous les moments passés ensemble et tous les moments à venir (en espérant que tu réussisses à trouver le temps et la motivation évidemment :D).

Pour finir, merci Moumoune et merci Ninou, vous êtes loin mais je sais que je pourrai toujours compter sur vous.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Introduction générale | 1 |
| 1 Imagerie de fluorescence en milieu diffusant | 5 |
| 1.1 Interaction entre la lumière et les tissus | 5 |
| 1.1.1 Absorption | 5 |
| 1.1.2 Diffusion | 6 |
| 1.1.3 Equation de transfert radiatif | 8 |
| 1.1.4 Approximation de la diffusion | 9 |
| 1.1.5 Fluorescence | 11 |
| 1.2 Code Monte-Carlo | 12 |
| 1.2.1 Description et implémentation | 12 |
| 1.2.2 Illustration sur un exemple | 13 |
| 1.3 Imagerie moléculaire | 16 |
| 1.3.1 Généralités et description de la méthode | 16 |
| 1.3.2 Marqueurs | 19 |
| 1.4 Signaux parasites et méthodes d'élimination existantes | 21 |
| 1.4.1 Autofluorescence | 21 |
| 1.4.2 Fluorescence non spécifique | 24 |
| 1.4.3 Fuites d'excitation | 24 |
| 1.4.4 Absorption du milieu | 25 |
| 1.5 Problématique posée et solution proposée | 26 |
| 2 Méthodes envisagées pour l'amélioration du contraste et de la résolution spatiale | 29 |
| 2.1 Etude préliminaire | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2 | Formation de l'image en illumination uniforme | 31 |
| 2.3 | Méthode de détection localisée | 34 |
| 2.3.1 | Théorie et simulation | 34 |
| 2.3.2 | Détection localisée simple | 36 |
| 2.3.3 | Détection localisée avec soustraction du voisinage | 41 |
| 2.4 | Méthode d'illumination structurée | 44 |
| 2.4.1 | Principe de la méthode | 44 |
| 2.4.2 | Effets de bord observés | 45 |
| 2.5 | Méthode tirant parti du lien entre les signaux d'excitation et d'autofluorescence | 48 |
| 2.5.1 | Hypothèse | 48 |
| 2.5.2 | Simulation | 49 |
| 2.5.3 | Vérification expérimentale | 54 |
| 2.6 | Conclusion | 59 |
| 3 | Système d'acquisition et supports d'étude | 63 |
| 3.1 | Montage optique utilisé | 63 |
| 3.2 | Expériences sur fantômes | 66 |
| 3.3 | Validation <i>in vivo</i> sur petit animal | 70 |
| 3.4 | Proposition d'amélioration du montage pour une implémentation en temps réel | 73 |
| 4 | Etude de l'amélioration du contraste et de la résolution sur fantômes et validation <i>in vivo</i> sur petit animal | 77 |
| 4.1 | Résultats préliminaires | 77 |
| 4.2 | Amélioration du contraste : inclusion unique à différentes profondeurs | 81 |
| 4.2.1 | Difficultés rencontrées en illumination uniforme | 81 |
| 4.2.2 | Fantômes avec une faible autofluorescence | 82 |
| 4.2.3 | Fantômes avec une forte autofluorescence | 89 |
| 4.3 | Amélioration de la résolution spatiale : étude sur fantômes complexes | 97 |

| | | |
|-----------------------------------|--|------------|
| 4.3.1 | Difficultés rencontrées en illumination uniforme | 97 |
| 4.3.2 | Fantômes avec une faible autofluorescence | 98 |
| 4.3.3 | Fantômes avec une forte autofluorescence | 112 |
| 4.4 | Sensibilité à la profondeur | 123 |
| 4.5 | Utilisation séquentielle des méthodes pour améliorer leurs résultats | 125 |
| 4.6 | Récapitulatif des résultats | 130 |
| 4.7 | Validation <i>in vivo</i> des méthodes : étude sur petit animal | 131 |
| 4.7.1 | Cas simple avec un capillaire en sous-cutané | 131 |
| 4.7.2 | Cas avec deux capillaires en sous-cutané à deux concentrations différentes : “effet d’écran” | 133 |
| 4.7.3 | Cas intermédiaire avec un capillaire au niveau de l’abdomen | 135 |
| 4.7.4 | Cas complexe avec un capillaire au niveau du thorax | 136 |
| 4.7.5 | Variation de la profondeur considérée dans un cas pratique | 140 |
| 4.7.6 | Conclusions sur ces résultats <i>in vivo</i> | 143 |
| 4.8 | Correction des hétérogénéités d’absorption | 144 |
| Conclusion et perspectives | | 153 |
| Bibliographie | | 159 |
| Annexes | | 169 |
| A | Détails des calculs des solutions de l’approximation de la diffusion en géométries planaires et cylindriques | 169 |
| A.1 | Géométrie planaire | 169 |
| A.2 | Géométrie cylindrique | 169 |
| B | Liste des publications et communications | 172 |
| B.1 | Revue à comité de lecture | 172 |
| B.2 | Congrès internationaux | 172 |
| B.3 | Congrès nationaux | 172 |

Table des figures

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Spectres d'absorption pour les principaux absorbants présents dans les tissus vivants | 6 |
| 1.2 | Diagramme de Jablonski illustrant les différentes étapes du processus de fluorescence | 11 |
| 1.3 | Algorithme de lancer de photon avec la méthode de Monte-Carlo | 13 |
| 1.4 | Exemple de trajectoire calculée avec le code de Monte-Carlo pour des temps compris entre 0 et 10 ns | 14 |
| 1.5 | Plusieurs trajectoires calculées avec le code de Monte-Carlo | 15 |
| 1.6 | Position moyenne des photons en fonction du temps dans un milieu homogène infini | 15 |
| 1.7 | Exemple de système de FDOT et exemple de reconstruction 3D obtenue en FDOT | 16 |
| 1.8 | Sonde FluoSTIC et exemple d'image de fluorescence obtenue en <i>in vivo</i> lors d'une détection et excision guidées de nodules dans la cavité péritonéale d'une souris | 18 |
| 1.9 | Illustration de l'effet EPR | 20 |
| 1.10 | Spectres d'absorption et d'émission des principaux fluorophores endogènes présents dans les tissus vivants | 22 |
| 2.1 | Description schématique du comportement de la lumière lorsqu'on excite un échantillon avec une ligne laser | 29 |
| 2.2 | Description schématique de la méthode permettant de retirer les signaux parasites localisés au niveau de la ligne d'excitation | 30 |
| 2.3 | Exemples d'images obtenues avec une véritable illumination uniforme et avec une somme d'images sur un fantôme avec quatre capillaires | 31 |
| 2.4 | Comparaison des profils d'intensité : véritable illumination uniforme, somme d'images, véritable illumination uniforme corrigée avec l'excitation | 32 |
| 2.5 | Profil d'intensité de la ligne d'excitation | 33 |
| 2.6 | Comparaison des profils d'intensité : en balayage parallèle, en balayage perpendiculaire avant et après correction | 33 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.7 | Géométries étudiées : planaire dans le cas de l'illumination uniforme, cylindrique dans le cas de l'illumination ligne | 34 |
| 2.8 | Schéma descriptif de la géométrie étudiée en simulation pour comparer les résolutions en illumination uniforme et en détection localisée | 35 |
| 2.9 | Largeur à mi-hauteur dans le cas d'une illumination ligne détectée sur l'excitation et dans le cas d'une illumination uniforme | 36 |
| 2.10 | Schéma de principe pour la reconstitution de l'image en illumination uniforme, en détection localisée simple et en détection localisée avec soustraction du voisinage | 37 |
| 2.11 | Maillage utilisé pour les simulations faites sous Nirfast | 38 |
| 2.12 | Influence de l'écart sources-détecteurs sur le contraste observé pour une inclusion à 8 profondeurs comprises entre 1 et 8 mm ; Ecart sources-détecteurs optimal et profondeur empirique | 39 |
| 2.13 | Influence de l'écart sources-détecteurs sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm et à 5 mm pour 5 niveaux d'autofluorescence | 40 |
| 2.14 | Représentation schématique du cas complexe considéré avec trois inclusions et représentation schématique du signal de fluorescence imagé sur le détecteur en illumination uniforme | 40 |
| 2.15 | Influence de l'écart sources-détecteurs sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm, une inclusion à 5 mm et une inclusion à 2 mm ayant un signal comparable à l'inclusion à 5 mm | 41 |
| 2.16 | Influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à 8 profondeurs comprises entre 1 et 8 mm ; Influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm pour 5 niveaux d'autofluorescence | 42 |
| 2.17 | Influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm, une inclusion à 5 mm et une inclusion à 2 mm avec un signal comparable à l'inclusion à 5 mm | 43 |
| 2.18 | Exemple d'illumination modulée à 3 phases décalées de 120° utilisée pour la technique d'illumination structurée | 44 |
| 2.19 | Schéma de principe de l'illumination structurée à partir des acquisitions avec une ligne | 45 |
| 2.20 | Origine des effets de bord due à la reconstruction | 46 |
| 2.21 | Evolution des effets de bords en fonction du niveau de fond | 47 |

| | | |
|------|---|----|
| 2.22 | Profils d'intensité de l'image AC et des images I_1 , I_2 et I_3 pour une fréquence faible et une fréquence élevée | 48 |
| 2.23 | Ratios d'intensité A/E obtenus avec le code de Monte Carlo pour des niveaux croissants de fluorescence et valeurs des pentes des ratios avec leur régression linéaire | 49 |
| 2.24 | Ratios d'intensité A/E obtenus avec NIRFAST pour des niveaux croissants de fluorescence et valeurs des pentes des ratios avec leur régression linéaire | 50 |
| 2.25 | Comparaison des profils d'intensité : à gauche : fluorescence brute F , auto-fluorescence, modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux ; à droite : F , $(F - M_1)$, $(F - M_2)$ | 51 |
| 2.26 | Comparaison des profils d'intensité : à gauche : fluorescence brute F , modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux ; à droite : F , $(F - M_1)$, $(F - M_2)$. . | 52 |
| 2.27 | Comparaison des profils d'intensité : à gauche : fluorescence brute F , modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux ; à droite : F , $(F - M_1)$, $(F - M_2)$. . | 53 |
| 2.28 | Profils d'intensité normalisés de la fluorescence brute F , de la soustraction de la modélisation avec les paramètres locaux M_1 à la fluorescence brute F et de la soustraction de la modélisation avec les paramètres globaux M_2 à la fluorescence brute F | 54 |
| 2.29 | Images reconstituées d'excitation et de fluorescence | 55 |
| 2.30 | Profils normalisés de l'autofluorescence et de l'excitation, et ratio de l'autofluorescence par l'excitation avec sa modélisation | 55 |
| 2.31 | Ratios d'intensité A/E obtenus expérimentalement pour des niveaux croissants de fluorescence et valeurs des pentes des ratios avec leur régression linéaire . . . | 56 |
| 2.32 | Exemple de modélisation de la fluorescence par l'excitation pour une colonne . | 57 |
| 2.33 | Exemple de modélisations pour cinq positions de la ligne autour d'une inclusion fluorescente | 58 |
| 2.34 | Exemple de résultat obtenu avec la modélisation par l'excitation | 58 |
| 3.1 | Montage optique utilisé lors des expériences préliminaires | 63 |
| 3.2 | Profil de transmission du filtre Semrock Razoredge 808 utilisé lors des expériences sur fantômes | 64 |
| 3.3 | Montage optique utilisé lors de l'étude | 65 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.4 | Exemples d'images acquises à différentes positions au fur et à mesure de la translation de l'objet sous la ligne d'excitation | 65 |
| 3.5 | Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'ICG encapsulé dans des nanoparticules lipidiques | 68 |
| 3.6 | Représentations schématiques des fantômes utilisés dans les différentes expériences | 70 |
| 3.7 | Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'Alexa Fluor 700 | 71 |
| 3.8 | Profils de transmission des filtres Chroma 725/50 et RG9 utilisés lors des expériences <i>in vivo</i> | 71 |
| 3.9 | Différentes configurations de capillaires étudiées en <i>in vivo</i> | 72 |
| 3.10 | Exemples d'images acquises à différentes positions au fur et à mesure de la translation du petit animal sous la ligne montrant la déformation de la ligne due au contour de la souris | 73 |
| 3.11 | Exemple de montage inspiré d'un système confocal à scanning bilatéral permettant de faire le masquage de la ligne directement lors de l'acquisition des images | 74 |
| 4.1 | Exemples d'images obtenues avant et après masquage, dans le cas d'un fantôme avec et sans autofluorescence | 78 |
| 4.2 | Comparaison des profils d'intensité du signal de fluorescence et du signal d'excitation parasite, et des profils d'intensité du signal de fluorescence et du signal d'autofluorescence à droite | 79 |
| 4.3 | Comparaison de l'évolution du contraste pour une illumination uniforme et pour une illumination par ligne que l'on masquerait avec différentes tailles de masque | 80 |
| 4.4 | Images de fluorescence acquises avec une illumination de type uniforme avec une inclusion à 10 profondeurs pour un niveau d'autofluorescence donné | 81 |
| 4.5 | Images de fluorescence acquises avec une illumination de type uniforme avec une inclusion à une profondeur donnée et cinq niveaux d'autofluorescence croissants | 82 |
| 4.6 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme et en détection localisée simple sur l'excitation ; Evolution du contraste en détection localisée simple en fonction de l'écart sources-détecteurs | 83 |
| 4.7 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme et en détection localisée avec soustraction du voisinage immédiat ; Evolution du contraste en détection localisée avec soustraction du voisinage en fonction de la taille du voisinage | 83 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.8 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme, avec la modélisation avec les paramètres locaux et avec la modélisation avec les paramètres globaux | 84 |
| 4.9 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme et en illumination structurée à la fréquence optimale ; Evolution du contraste en illumination structurée en fonction de la fréquence spatiale | 85 |
| 4.10 | Comparaison entre le contraste obtenu avec l'illumination uniforme, la détection localisée simple avec une distance de détection optimisée, la détection localisée avec soustraction du voisinage optimisée, l'illumination structurée avec la fréquence spatiale optimisée et la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux | 86 |
| 4.11 | Exemples d'images obtenues avec l'illumination uniforme et les méthodes de détection localisée pour une inclusion située à 1 mm et à 10 mm de profondeur | 87 |
| 4.12 | Exemples d'images obtenues avec l'illumination structurée et la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation pour une inclusion située à 1 mm et à 10 mm de profondeur | 88 |
| 4.13 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme et en détection localisée simple sur l'excitation ; Evolution du contraste en détection localisée simple en fonction de l'écart sources-détecteurs | 89 |
| 4.14 | Comparaison entre le contraste obtenu avec l'illumination uniforme et le contraste obtenu avec la détection localisée faite sur l'excitation pour 5 niveaux d'autofluorescence ; Evolution du contraste en détection localisée simple en fonction de l'écart sources-détecteurs | 90 |
| 4.15 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme et en détection localisée avec soustraction du voisinage immédiat ; Evolution du contraste en détection localisée avec soustraction du voisinage en fonction de la taille du voisinage | 91 |
| 4.16 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme, avec la modélisation avec les paramètres locaux et avec la modélisation avec les paramètres globaux | 92 |
| 4.17 | Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme et en illumination structurée à la fréquence optimale ; Evolution du contraste en illumination structurée en fonction de la fréquence spatiale | 92 |
| 4.18 | Comparaison entre le contraste obtenu avec l'illumination uniforme, la détection localisée simple avec une distance de détection optimisée, la détection localisée avec soustraction du voisinage optimisée, l'illumination structurée avec la fréquence spatiale optimisée et la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux | 93 |

| | | |
|------|---|-----|
| 4.19 | Exemples d'images obtenues avec l'illumination uniforme et les méthodes de détection localisée pour une inclusion située à 1 mm et à 10 mm de profondeur | 95 |
| 4.20 | Exemples d'images obtenues avec l'illumination structurée et la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation pour une inclusion située à 1 mm et à 10 mm de profondeur | 96 |
| 4.21 | Image obtenue en illumination uniforme d'un fantôme dans lequel on a immergé quatre capillaires | 97 |
| 4.22 | Images obtenues en illumination uniforme pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 98 |
| 4.23 | Images obtenues en détection localisée simple pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 99 |
| 4.24 | Images obtenues en détection localisée avec soustraction du voisinage pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 100 |
| 4.25 | Images obtenues en illumination structurée pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 100 |
| 4.26 | Images de la mire de fluorescence à 1 mm de profondeur obtenues en détection localisée simple, en détection localisée avec soustraction du voisinage et en illumination structurée pour deux sens de balayages perpendiculaires | 102 |
| 4.27 | Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 103 |
| 4.28 | Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes à quatre profondeurs : illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 105 |
| 4.29 | Images du fantôme à quatre capillaires obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple et détection localisée avec soustraction du voisinage; Profils d'intensité normalisés pour les trois méthodes | 107 |
| 4.30 | Description du fantôme étudié avec deux concentrations et images obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 108 |
| 4.31 | Profils d'intensité normalisés pour les images en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 109 |

| | | |
|------|---|-----|
| 4.32 | Description du fantôme étudié avec trois concentrations et images obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 110 |
| 4.33 | Profils d'intensité normalisés pour les images en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 111 |
| 4.34 | Images obtenues en illumination uniforme pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 112 |
| 4.35 | Images obtenues en détection localisée simple pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 113 |
| 4.36 | Images obtenues en détection localisée avec soustraction du voisinage pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 114 |
| 4.37 | Images obtenues en illumination structurée pour quatre profondeurs différentes et profils d'intensité normalisés | 114 |
| 4.38 | Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 116 |
| 4.39 | Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes à quatre profondeurs : illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée | 118 |
| 4.40 | Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs obtenues en illumination uniforme et avec modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres locaux et avec les paramètres globaux | 120 |
| 4.41 | Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes à quatre profondeurs : illumination uniforme, modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux et modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux | 121 |
| 4.42 | Images de la mire de fluorescence à 1 et 2 mm obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée dans le cas d'un fantôme fortement autofluorescent non homogène | 122 |
| 4.43 | Images du fantôme à quatre capillaires obtenues en illumination structurée à différentes fréquences spatiales | 124 |
| 4.44 | Profils d'intensité pris perpendiculairement aux capillaires obtenus avec les différentes fréquences spatiales comparés au profil obtenu avec une illumination uniforme | 124 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.45 | Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs obtenues en détection localisée simple seule et combinée à la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux, et en détection localisée avec soustraction du voisinage seule et combinée à la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux | 126 |
| 4.46 | Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs obtenues en illumination structurée seule, combinée à la modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux, et combinée à la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux combinée à l'illumination structurée | 127 |
| 4.47 | Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes à quatre profondeurs : illumination uniforme, illumination structurée, modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux combinée à l'illumination structurée et modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux combinée à l'illumination structurée | 129 |
| 4.48 | Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas d'un capillaire unique positionné en sous-cutané | 132 |
| 4.49 | Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas d'un capillaire unique positionné en sous-cutané | 133 |
| 4.50 | Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas de deux capillaires positionnés en sous-cutané à deux concentrations différentes | 134 |
| 4.51 | Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas de deux capillaires positionnés en sous-cutané à deux concentrations différentes | 134 |
| 4.52 | Profil d'intensité pris perpendiculairement aux deux capillaires pour chacune des méthodes | 135 |
| 4.53 | Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau de l'abdomen | 136 |
| 4.54 | Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau de l'abdomen | 137 |
| 4.55 | Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau du thorax | 138 |
| 4.56 | Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau du thorax | 138 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.57 | Image en lumière blanche avec le capillaire sorti; Images en illumination uniforme avec et sans le capillaire; Image en détection localisée simple avec un écart sources-détecteurs de 8 mm avec et sans le capillaire | 139 |
| 4.58 | Image obtenue en illumination uniforme avec un capillaire inséré au niveau de l'abdomen | 141 |
| 4.59 | Variation de la profondeur sondée en modifiant la fréquence spatiale de l'illumination structurée dans un cas <i>in vivo</i> | 141 |
| 4.60 | Variation de la profondeur sondée en modifiant l'écart sources-détecteurs en détection localisée simple dans un cas <i>in vivo</i> | 142 |
| 4.61 | Exemple d'effet parasite dû à l'absorption en illumination uniforme | 145 |
| 4.62 | Comparaison des profils d'intensité : à gauche : fluorescence brute F , autofluorescence, modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux; à droite : F , $F - M_1$, $F - M_2$ | 146 |
| 4.63 | Profils normalisés de l'autofluorescence et de l'excitation, et ratio de l'autofluorescence par l'excitation avec sa modélisation | 147 |
| 4.64 | Images obtenues avec les différentes méthodes pour deux configurations : les deux capillaires ont le même coefficient d'absorption et le capillaire supérieur à une absorption dix fois plus importante | 148 |
| 4.65 | Profils d'intensité de fluorescence pour un même coefficient d'absorption et pour des coefficients d'absorption avec un facteur 10 obtenus en illumination uniforme, avec le ratio de la fluorescence par l'excitation, avec la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres locaux et avec les paramètres globaux | 149 |
| 4.66 | Profils d'intensité de fluorescence normalisés pour un même coefficient d'absorption et pour des coefficients d'absorption avec un facteur 10 obtenus en illumination uniforme, avec le ratio de la fluorescence par l'excitation, avec la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres locaux et avec les paramètres globaux | 150 |

Introduction générale

Depuis quelques années, les techniques d'imagerie de fluorescence font l'objet d'une attention particulière. Elles offrent une alternative intéressante aux autres méthodes de diagnostic médical comme l'imagerie à rayons X puisqu'elles sont peu coûteuses et non ionisantes. De plus, les progrès récents effectués au niveau des marqueurs fluorescents permettent d'étudier de manière non invasive l'expression de gènes, les fonctions des protéines, les interactions entre protéines, et un nombre important de processus cellulaires, tout cela avec une sensibilité et un contraste accrus.

Parmi les méthodes d'imagerie de fluorescence, on peut distinguer les techniques tomographiques des techniques planaires, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients. La tomographie optique diffuse de fluorescence (abrégiée FDOT pour *Fluorescence Diffuse Optical Tomography*) a pour objectif la reconstruction en trois dimensions de la localisation des fluorophores dans le milieu étudié. Cette méthode consiste à illuminer le milieu à plusieurs endroits différents et à récupérer le signal sortant sur plusieurs détecteurs. On utilise ensuite un modèle mathématique décrivant la propagation des photons au sein du milieu afin d'obtenir la représentation tridimensionnelle de la fluorescence dans l'objet d'étude. Il est ainsi possible d'observer et de quantifier les phénomènes d'intérêt grâce aux marqueurs fluorescents avec une résolution de l'ordre du millimètre.

Notre étude concerne les techniques planaires, ces systèmes étant préférés pour les applications cliniques où une instrumentation robuste, des acquisitions en temps réel et un large champ sont requis. Ces méthodes consistent à illuminer le milieu avec une source étendue et à détecter le signal sortant du milieu avec un détecteur tel qu'une caméra CCD, ceci pouvant être réalisé en transmission ou bien en rétrodiffusion. Nous allons nous intéresser aux méthodes en rétrodiffusion, celles-ci étant privilégiées dans le cas de l'homme où les distances à traverser par la lumière peuvent être importantes puisqu'elles permettent une implémentation plus simple au niveau instrumental qui autorise même des sondes portables. On parle alors de FRI pour *Fluorescence Reflectance Imaging*.

Les techniques de FRI présentent plusieurs avantages en termes de facilité de mise en œuvre, de rapidité et de coût, mais elles sont aussi sujettes à des limites fortes : la pénétration des tissus reste relativement faible (quelques millimètres seulement), et il est impossible d'avoir une information quantitative du fait de la diffusion des photons : deux cibles fluorescentes de concentrations différentes à des profondeurs différentes pourront avoir le même signal au niveau du détecteur. Ceci va impacter fortement le contraste avec laquelle la fluorescence d'intérêt va être observée ainsi que la résolution des cibles fluorescentes. Le fait d'utiliser le domaine spectral du proche infrarouge permet de réduire en partie ces limites. En effet, dans cette bande spectrale, la pénétration des tissus est plus grande que dans le visible, et les fluorophores intrinsèques des tissus ont un signal moins important, mais cela n'est tout de même pas suffisant pour avoir des performances comparables à la FDOT.

L'objectif de la thèse est de réduire les effets des signaux parasites afin d'améliorer les performances de la FRI aussi bien au niveau du contraste que de la résolution. Pour ce faire

nous avons décidé d'utiliser de nouvelles techniques d'illumination et de détection. Contrairement aux systèmes classiques qui utilisent une illumination et une détection large champ, nous balayons l'objet d'étude avec une ligne laser, des images étant acquises à chaque position de la ligne. On a alors accès à une pile d'images contenant un nombre d'informations bien plus important que dans le cas classique. Plusieurs façons de traiter ces informations ont été étudiées.

Ce manuscrit va s'articuler de la manière suivante.

Dans le premier chapitre, nous allons présenter les éléments nécessaires à la bonne compréhension du sujet. Nous ferons tout d'abord un bref rappel sur les principes physiques régissant les interactions entre la lumière et les tissus vivants ainsi que sur la méthode de Monte-Carlo qui permet de décrire ces interactions. Nous présenterons ensuite les techniques d'imagerie moléculaire existantes, puis nous présenterons les différents signaux parasites qui peuvent détériorer les résultats en imagerie moléculaire ainsi que les méthodes utilisées pour minimiser ces signaux parasites.

Le chapitre 2 présentera en détail les différentes méthodes proposées pour notre étude :

- des techniques de détection localisée, pour lesquelles seules certaines zones spécifiques de chaque image vont être détectées, ceci nous permettant de ne considérer que certains photons lors de la formation de l'image finale,
- une technique d'illumination structurée consistant à moduler la pile d'images afin d'obtenir des résultats similaires à une illumination sinusoïdale comme par exemple la sélection de la profondeur de sonde en fonction de la fréquence spatiale de modulation,
- une technique de modélisation du signal d'autofluorescence parasite à partir des images prises à la longueur d'onde d'excitation.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons le protocole expérimental en détaillant le montage utilisé ainsi que les différents fantômes optiques simulant des tissus vivants avec différentes configurations de cibles fluorescentes. Ces différentes configurations nous permettent de mettre en évidence les améliorations obtenues de préférence au niveau du contraste ou bien de la résolution. Nous présenterons aussi le protocole suivi lors de la validation *in vivo* de nos méthodes faite sur petit animal.

Le chapitre 4 présentera quant à lui les différents résultats obtenus avec l'ensemble de nos méthodes. Nous montrerons les améliorations en termes de contraste et de résolution en comparant les techniques proposées à l'illumination uniforme classique. Nous exposerons en quoi nos méthodes permettent d'avoir une sensibilité accrue à la profondeur des cibles par rapport à l'illumination uniforme. Nous présenterons aussi dans ce chapitre les résultats obtenus lors de la validation *in vivo* de nos méthodes faite sur petit animal dans quatre cas concrets de difficulté croissante. Enfin, nous parlerons des apports potentiels de la technique de modélisation du signal par l'excitation concernant la correction des hétérogénéités d'absorption.

Nous concluons ce manuscrit en donnant les perspectives envisagées après la thèse.

Imagerie de fluorescence en milieu diffusant

Dans ce premier chapitre, nous allons présenter les éléments nécessaires à la bonne compréhension du sujet. Tout d'abord, nous exposerons les principes physiques qui régissent les interactions entre la lumière et les tissus vivants, ainsi que les modèles mathématiques utilisés pour décrire la propagation de la lumière au sein des tissus. Nous présenterons aussi la méthode de Monte-Carlo qui nous permet de simuler la propagation de la lumière en se basant sur ces mêmes modèles mathématiques. Ensuite, nous parlerons des techniques d'imagerie moléculaire existantes en donnant leurs avantages et leurs inconvénients. Enfin, nous présenterons les différents signaux parasites qui peuvent détériorer les signaux en imagerie moléculaire et les méthodes utilisées pour minimiser ces signaux. Nous conclurons ce premier chapitre en exposant la problématique qui nous est posée et en introduisant notre technique.

1.1 Interaction entre la lumière et les tissus

Le transport des photons au sein des tissus est principalement sujet aux phénomènes d'absorption et de diffusion. Dans cette partie, nous allons exposer ces deux processus fondamentaux.

1.1.1 Absorption

L'absorption de la lumière, caractérisée par le coefficient d'absorption μ_a (en cm^{-1}), peut se décrire à partir de deux échelles différentes.

Au niveau microscopique, la probabilité dp d'absorption d'un photon sur un trajet élémentaire dl est définie par $dp = \mu_a dl$. Le coefficient d'absorption permet de définir le libre parcours moyen d'absorption $l_a = 1/\mu_a$ qui définit la distance moyenne parcourue par un photon avant son absorption.

Au niveau macroscopique, l'absorption permet de décrire la décroissance de l'intensité subie par une onde électromagnétique lors de la traversée d'un milieu homogène par le biais de l'équation de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu_a(\lambda)x} \quad (1.1)$$

Où I_0 est l'intensité du faisceau incident, I l'intensité du faisceau sortant et x la distance parcourue au sein du milieu. Le coefficient d'absorption dépend de la longueur d'onde λ considérée.

Comme nous l'expliquions précédemment, une des principales limites des techniques d'imagerie moléculaire est la faible distance de pénétration des photons au sein des tissus. Pour comprendre et minimiser ce phénomène, il faut s'intéresser aux principaux absorbants présents dans les tissus, à savoir l'hémoglobine (oxygénée et désoxygénée), l'eau et la graisse. Les coefficients d'absorption de ces absorbants sont donnés pour une gamme de longueur d'onde dans le proche infrarouge comprise entre 600 et 1100 nm sur la figure 1.1.

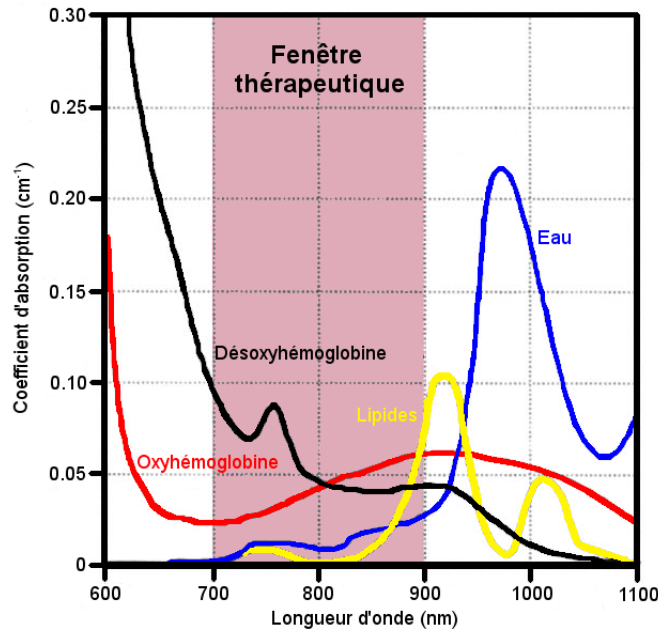


FIGURE 1.1 – Spectres d'absorption pour les principaux absorbants présents dans les tissus vivants (adapté de <http://omlc.ogi.edu/spectra/fat>).

On voit clairement sur cette figure qu'il existe une bande de longueurs d'onde comprises entre 700 et 900 nm que l'on appelle fenêtre thérapeutique où les coefficients d'absorption sont les plus faibles (d'un facteur au moins 10 par rapport à ce que l'on a dans l'UV ou le visible^[1]). On utilise donc ces longueurs d'onde pour faire de l'imagerie car la lumière pénètre alors plus profondément dans les tissus.

1.1.2 Diffusion

On parle de diffusion élastique dans le cas d'une interaction entre un photon et un atome suivie par la réémission d'un photon à la même fréquence que le photon incident sans transfert

de l'énergie d'excitation vers un autre type d'énergie. Lors de ce processus, l'énergie du photon est conservée et seule sa direction est modifiée.

Les caractéristiques de l'onde diffusée dépendent de la taille des particules diffusantes par rapport à la longueur d'onde, et l'on peut faire la distinction entre trois régimes :

- la diffusion de Rayleigh : elle est due aux particules de petits diamètres ϕ devant la longueur d'onde λ ($\phi \ll \lambda$)
- la diffusion de Mie : le domaine d'étude concerne les cas où le diamètre de la particule est largement supérieur à la longueur d'onde ($\phi \gg \lambda$)
- dans le cas de particules de taille macroscopique comme par exemple des gouttes d'eau, on peut appliquer les lois de la diffraction

Comme pour l'absorption, on utilise un paramètre, le coefficient de diffusion μ_s (en cm^{-1}) pour caractériser la diffusion. A l'échelle microscopique, la probabilité dp de diffusion d'un photon sur un trajet élémentaire dl est définie par $dp = \mu_s dl$. On peut définir le libre parcours moyen de diffusion l_s qui correspond à la distance moyenne parcourue par un photon avant diffusion. Après une diffusion, le photon va changer de direction de manière aléatoire, la direction adoptée étant décrite par la fonction φ : la probabilité que le photon conserve sa direction est $1 - \mu_s dl$, la probabilité que celui-ci prenne la direction $\vec{\Omega}$ en venant de la direction $\vec{\Omega}'$ est $\mu_s dl \varphi(\vec{\Omega}', \vec{\Omega})$.

On définit aussi le facteur d'anisotropie g comme le cosinus moyen de l'angle de déviation après une diffusion :

$$g = \langle \vec{\Omega}' \cdot \vec{\Omega} \rangle = \langle \cos(\theta) \rangle = \int_{4\pi} \cos(\theta) \cdot \varphi(\cos(\theta)) d\Omega \quad (1.2)$$

Ce facteur g a donc théoriquement une valeur comprise entre -1 (pour une rétrodiffusion totale) et 1 (pour une diffusion totalement vers l'avant). Il peut prendre deux valeurs notables :

- $g = 0$: cette valeur décrit une diffusion totalement isotrope, tous les angles de déviation étant équiprobables (c'est le cas décrit par l'approximation de la diffusion dont nous parlerons plus loin dans ce chapitre).
- $g = 0,9$: c'est la valeur classiquement utilisée pour décrire les tissus biologiques, la diffusion se fait principalement vers l'avant.

On peut ensuite définir la répartition des angles de diffusion θ à partir de la fonction de Henyey-Greenstein $H(\theta)$ [2] qui a pour paramètre g ($g \in [0; 1]$ dans ce cas) :

$$H(\theta) = \frac{1}{2} \left[\frac{1 - g}{1 - 2g\cos(\theta) + g^2} \right] \quad (1.3)$$

Cette fonction sera notamment utile pour les calculs Monte-Carlo comme nous le verrons

dans la partie 1.2.

Enfin, nous pouvons définir à partir du facteur d'anisotropie, le coefficient de diffusion réduit $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$. Ce coefficient est l'inverse de la distance moyenne l^* parcourue par les photons le long de leur direction d'origine.

Dans le tableau suivant on a répertorié quelques valeurs de propriétés optiques pour différents organes^[3, 4, 5, 6, 7].

| Tissu | $\lambda(nm)$ | $\mu_a(cm^{-1})$ | $\mu'_s(cm^{-1})$ |
|----------|---------------|------------------|-------------------|
| peau | 750 - 800 | 0,25 - 2,5 | 8 - 150 |
| cerveau | 800 - 1100 | 0,2 - 1 | 10 - 40 |
| poumon | 635 | 8,1 | 81 |
| muscle | 900 | 0,32 | 5,9 |
| sein | 750 - 790 | 0,01 - 0,27 | 5 - 13 |
| prostate | 850 | 0,6 | 14 |

TABLE 1.1 – Propriétés optiques de quelques organes pour des longueurs d'onde du proche infrarouge

1.1.3 Equation de transfert radiatif

La propagation de la lumière dans un milieu diffusant peut être décrite par l'équation de transfert radiatif (ETR)^[8, 9, 10, 11]. Cette équation a été introduite en 1943 par Chandrasekhar^[12] pour décrire la propagation de particules sujettes à l'absorption et la diffusion. Pour obtenir l'ETR, il faut partir de l'équation de conservation du nombre de photons N se propageant dans une direction $\vec{\Omega}$ donnée :

$$div(n\vec{v}) + \frac{\partial n}{\partial t} = s - p \quad (1.4)$$

avec $n = \frac{\partial N}{\partial V}$ la densité volumique de photons, \vec{v} la vitesse de propagation et s et p les densités volumiques et temporelles de sources et de pertes de photons.

Pour décrire la densité surfacique de photons $n\vec{v}$ dans la direction $\vec{\Omega}$, on utilise la notion de luminance. La luminance L (en $W/sd/m^2$) est la grandeur permettant de décrire la densité de puissance lumineuse en tout point de l'espace et du temps et dans toutes les directions. Pour un élément de surface dS , la puissance traversant cet élément et se dirigeant dans l'angle solide $d\vec{\Omega}$ faisant un angle $\cos(\theta)$ par rapport à dS s'écrit :

$$d^4P = L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}).\cos(\theta).d^2\vec{\Omega}.d^2S \quad (1.5)$$

La densité surfacique de photons $n\vec{v}$ dans la direction $\vec{\Omega}$ s'écrit donc $L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}).\vec{\Omega}$.

Comme on a $\vec{v} = c\vec{\Omega}$, on a alors $n = L/c$. Les pertes dans l'ETR sont dues à la diffusion et l'absorption des photons dans un élément dV . Pendant un temps dt , celles-ci peuvent s'écrire $(\mu_s(\vec{r}) + \mu_a(\vec{r})) \cdot L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}) \cdot dV \cdot dt$. Les sources quant à elles sont partagées entre les photons diffusés précédemment qui vont repartir dans la direction $d\vec{\Omega}$ et les sources volumiques S présentes en dV .

L'équation de transfert radiatif peut donc finalement s'écrire^[11] :

$$\begin{aligned}
 & \underbrace{\vec{\Omega} \cdot \vec{\text{grad}}(L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}))}_{\text{Variations spatiales}} + \underbrace{\frac{\partial L(\vec{r}, t, \vec{\Omega})}{c \partial t}}_{\text{Variations temporelles}} + \underbrace{(\mu_s(\vec{r}) + \mu_a(\vec{r})) \cdot L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}) \cdot dV \cdot dt}_{\text{Pertes dues à l'absorption et la diffusion}} = \\
 & \underbrace{\mu_s(\vec{r}) \int L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}') \cdot \varphi(\vec{\Omega}', \vec{\Omega}) \cdot d\vec{\Omega}'}_{\text{Gain provenant des photons diffusés précédemment}} + \underbrace{S(\vec{r}, t, \vec{\Omega})}_{\text{Sources présentes dans l'élément de volume}} \quad (1.6)
 \end{aligned}$$

Il est possible de résoudre numériquement cette équation de façon à avoir la meilleure description possible de la propagation de la lumière^[13, 14, 15, 16, 17]. Cependant, les méthodes à utiliser sont coûteuses en ressources (méthode des directions discrètes ou méthode des harmoniques sphériques^[18, 19, 20, 21] par exemple) ou en temps (méthode de Monte Carlo dont nous parlerons dans la prochaine section). On préfère donc souvent résoudre l'équation de la diffusion qui est un modèle de propagation simplifié.

1.1.4 Approximation de la diffusion

L'approximation de la diffusion est une équation simplifiée obtenue à partir de l'ETR en faisant plusieurs approximations que nous allons présenter dans cette section. Il existe de nombreuses références détaillant le passage de l'ETR à l'approximation de la diffusion comme par exemple l'article de référence d'Arridge^[18].

Approximation P_N

Cette première approximation consiste à décomposer les fonctions φ , L et S en harmoniques sphériques ou en polynômes de Legendre à un ordre N . Le détail des calculs étant disponible dans la référence précédemment citée^[18], nous donnons ici directement les décompositions en harmoniques obtenues :

$$\varphi(\vec{\Omega}, \vec{\Omega}') = \sum_{i=0}^N \sum_{j=-i}^i g_i Y_{i,j}^*(\vec{\Omega}') Y_{i,j}(\vec{\Omega}) \quad (1.7)$$

$$L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}) = \sum_{i=0}^N \sum_{j=-i}^i \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi}} L_{i,j}(\vec{r}, t) Y_{i,j}(\vec{\Omega}) \quad (1.8)$$

$$S(\vec{r}, t, \vec{\Omega}) = \sum_{i=0}^N \sum_{j=-i}^i \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi}} S_{i,j}(\vec{r}, t) Y_{i,j}(\vec{\Omega}) \quad (1.9)$$

avec i l'ordre des polynômes de Legendre, $Y_{i,j}$ les harmoniques sphériques et g_i , $L_{i,j}$, $S_{i,j}$ les coefficients des décompositions.

Approximation P_1

On simplifie encore l'équation en développant la fonction L à l'ordre 1. Celle-ci s'écrit alors :

$$L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}) = \frac{1}{4\pi} \phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{J}(\vec{r}, t) \cdot \vec{\Omega} \quad (1.10)$$

avec ϕ la densité de photons diffusés en $W.cm^{-2}$:

$$\phi(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}) d\vec{\Omega} \quad (1.11)$$

et \vec{J} le flux de photons diffusés en $W.m^{-2}$:

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, t, \vec{\Omega}) \vec{\Omega} d\vec{\Omega} \quad (1.12)$$

Approximation de la diffusion

Deux hypothèses viennent enfin s'ajouter aux approximations précédentes et dictent les conditions d'application de l'approximation de la diffusion :

- On suppose que la source est isotrope, tous les termes non-isotropes étant donc ignorés
- Les variations temporelles du flux de photons $\vec{J}(\vec{r}, t)$ sont négligeables

On obtient alors l'équation simplifiée :

$$\frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{c \partial t} - \text{div}(D(\vec{r}) \overrightarrow{\text{grad}}(\Phi(\vec{r}, t))) + \mu_a(\vec{r}) \Phi(\vec{r}, t) = S(\vec{r}, t) \quad (1.13)$$

avec $D = 1/3\mu'_s$ le coefficient de diffusion^[22]. Cette équation est plus simple à résoudre car elle ne dépend plus que de l'espace et du temps mais plus de l'angle d'observation. Le champ $\Phi(\vec{r}, t)$ appelé densité de photons s'obtient alors en intégrant la luminance L suivant tous les angles d'observation Ω .

Domaine de validité

Pour que les approximations permettant de passer de l'ETR à l'approximation de la diffusion soient valides, il faut donc vérifier deux conditions : 1) le coefficient d'absorption μ_a doit être négligeable devant le coefficient de diffusion réduit μ'_s , et 2) les distances de propagation doivent être grandes par rapport au libre parcours moyen l^* .

La première condition est valable dans le domaine de l'infrarouge pour la plupart des tissus biologiques mais pas pour la totalité. Des études ont démontré que, pour un coefficient μ'_s 100 fois supérieur au coefficient μ_a , l'ETR et l'approximation de la diffusion donnent des résultats similaires. Ils divergent toutefois si cette condition n'est pas remplie.

La deuxième condition peut ne pas être remplie dans le cas de petits volumes considérés comme le doigt ou le cerveau du petit animal, il est alors nécessaire de résoudre l'ETR pour s'affranchir des erreurs liées à l'approximation de la diffusion.

1.1.5 Fluorescence

La fluorescence est le phénomène qui survient lorsqu'une molécule fluorescente appelée fluorophore absorbe un photon à une longueur d'onde spécifique appelée longueur d'onde d'excitation pour émettre un photon à une longueur d'onde supérieure appelée longueur d'onde d'émission (le décalage entre les deux longueurs d'onde est appelé décalage de Stokes).

Ce phénomène d'absorption et d'émission est généralement illustré par le diagramme de Jablonski visible en figure 1.2.

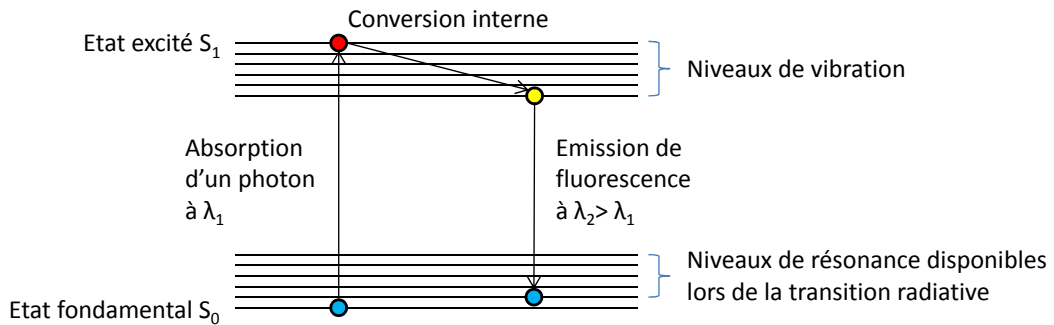


FIGURE 1.2 – Diagramme de Jablonski illustrant les différentes étapes du processus de fluorescence (inspiré de [23]).

Les étapes menant à l'émission de fluorescence sont les suivantes :

- La molécule absorbe un photon à la longueur d'onde d'excitation, entraînant une exci-

tation électronique.

- Il y a ensuite un phénomène de conversion interne où la molécule va redescendre au plus bas des niveaux énergétiques de vibration. Cette conversion interne est rapide (de l'ordre de la picoseconde) et s'accompagne d'une dissipation thermique.

- Il y a émission d'un photon lorsque la molécule revient à son état fondamental, la durée moyenne avant l'émission variant suivant la molécule.

On modélise généralement la probabilité d'émission d'un photon par un fluorophore excité par le biais d'une exponentielle décroissante :

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.14)$$

avec τ la durée de vie du fluorophore et $I(t)$ la variation d'intensité lumineuse produite par le fluorophore.

On notera que le spectre d'émission est indépendant de la longueur d'onde d'excitation, mais l'intensité d'émission est proportionnelle à l'intensité d'excitation. De plus, les spectres d'émission et d'excitation des composés fluorescents purs sont symétriques par rapport à un plan médian.

Comme on le verra dans le paragraphe 1.3.2, il existe des fluorophores endogènes naturellement présents dans les tissus qui vont être responsables de l'autofluorescence parasite que nous essayons de réduire, et des fluorophores exogènes que nous allons utiliser pour cibler les processus moléculaires d'intérêt.

1.2 Code Monte-Carlo

1.2.1 Description et implémentation

Comme nous le disions dans le chapitre précédent, pour décrire la propagation de la lumière à un niveau macroscopique il est possible d'utiliser la méthode dite de Monte Carlo^[24, 25]. Cette méthode permet de calculer l'espérance $E[G(U)]$ d'une fonction G de la variable aléatoire U . Ce calcul se fait grâce à un grand nombre de tirages aléatoires, et, dans le cas de probabilités discrètes, on a alors :

$$E[G(U)] = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{\sum_{k=0}^N G(u_k)}{N} \quad (1.15)$$

Dans notre cas, nous nous intéressons à l'espérance $G_{MC}(r, t)$ qu'un photon émis au point r_0 à l'instant t_0 soit soumis à un événement de diffusion sur le trajet $(\vec{r}, \vec{r} + \vec{dr})$ pendant l'intervalle de temps $(t, t + dt)$. Cette espérance $G_{MC}(r, t)$ est proportionnelle à la densité de

photons. Cette espérance se calcule avec la méthode de Monte-Carlo en faisant un nombre important de tirages de trajectoires u_k définies comme étant des listes d'événements de diffusion $u_k = (\vec{r}_i, t_i)_k$. L'espérance $G_{MC}(r, t)$ est alors la fonction qui compte le nombre d'interactions dans les intervalles de temps et d'espace qui nous intéressent.

On peut ainsi simuler la propagation de la lumière en utilisant les lois de probabilités adéquates : la distance parcourue entre deux étapes suit une loi exponentielle, le cosinus de la déviation suit la fonction de Henyey-Greenstein, tandis que le deuxième angle de déviation suit une loi de probabilité uniforme. Dans le cas simple d'un milieu homogène infini, l'algorithme est schématisé sur la figure 1.3.

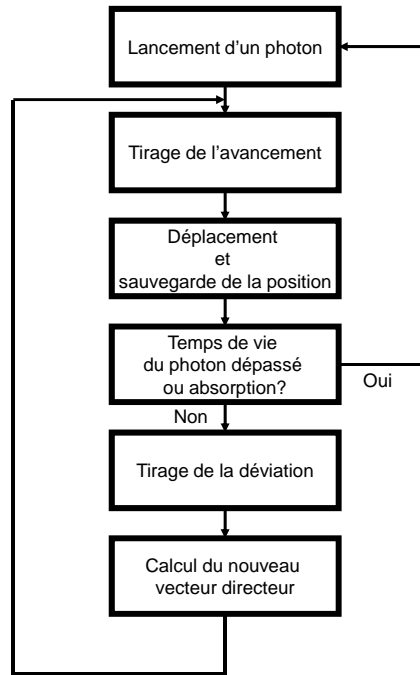


FIGURE 1.3 – Algorithme de lancer de photon avec la méthode de Monte-Carlo.

Dans le cas d'un milieu fini, il faut aussi prendre en compte les effets des réfractions et des transmissions aux interfaces.

1.2.2 Illustration sur un exemple

Dans un premier temps, nous nous intéressons au cas d'un milieu homogène infini ayant des propriétés optiques proches de celles des tissus vivants ($\mu_a = 0 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,9$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$). L'absorption est choisie nulle car elle peut être prise en compte en multipliant les résultats *a posteriori* par le facteur $\exp(-\mu_a \cdot c \cdot t)$. Des photons sont injectés au temps $t = 0$ à la position $(0,0,0)$ dans la direction $(0,0,1)$.

On peut voir sur la figure 1.4 deux comportements. On a d'une part le fait que l'information sur la direction d'origine est rapidement perdue. Par contre, si l'on considère une plage de

temps très courte, les photons ont une trajectoire qui varie faiblement entre deux événements de diffusion (zoom sur la figure). Le suivi se fait uniquement entre 0 et 10 ns car, pour une absorption typique $\mu_a = 0,1 \text{ cm}^{-1}$, on a $\exp(-\mu_a \cdot c \cdot t) = 9 \cdot 10^{-14}$, le taux de survie des photons est alors négligeable pour des temps plus longs.

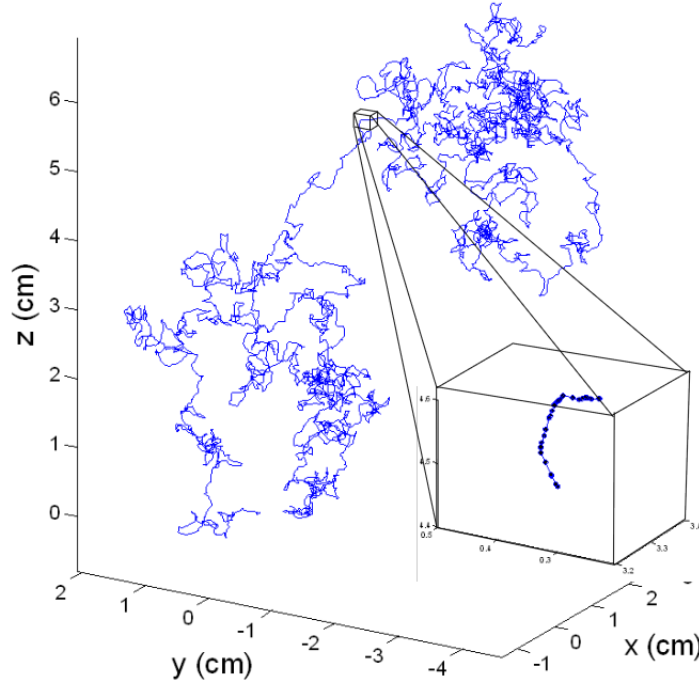


FIGURE 1.4 – Exemple de trajectoire calculée avec le code de Monte-Carlo pour des temps compris entre 0 et 10 ns.

Ces deux comportements sont aussi visibles lorsque l'on considère un nombre important de trajectoires (figure 1.5). En effet, pour un temps très court $t = 0,003 \text{ ns}$, les photons suivent encore leur trajectoire d'origine, alors que pour un temps plus long $t = 0,09 \text{ ns}$ la répartition des photons est alors isotrope.

En considérant une statistique plus importante, on peut illustrer la notion de coefficient de diffusion réduit. Sur la figure 1.6, on voit que la position moyenne des photons se déplace très rapidement entre 0 et 0,006 ns pour atteindre une position stable située à la distance $l^* = 1 \text{ mm}$ précédemment définie.

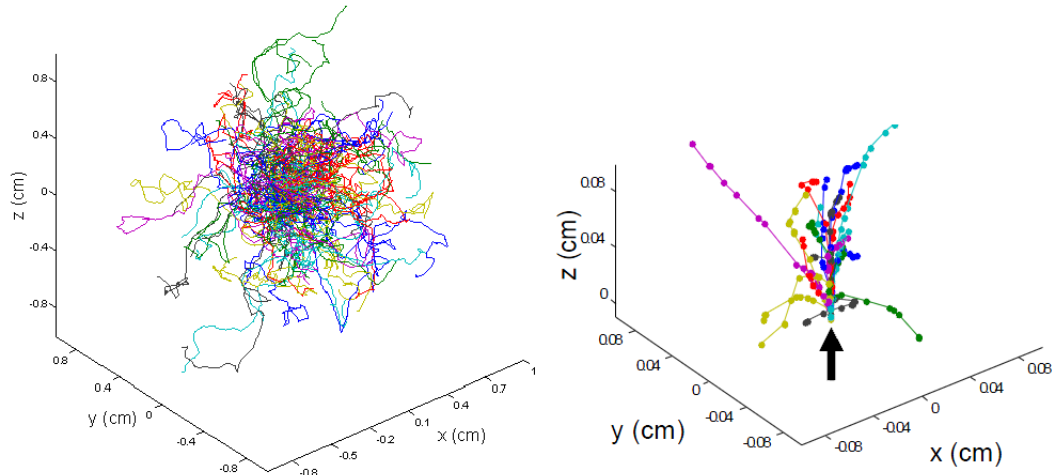


FIGURE 1.5 – Plusieurs trajectoires calculées avec le code de Monte-Carlo; à gauche : temps compris entre 0 et 0,9 ns; à droite : temps compris entre 0 et 0,003 ns.

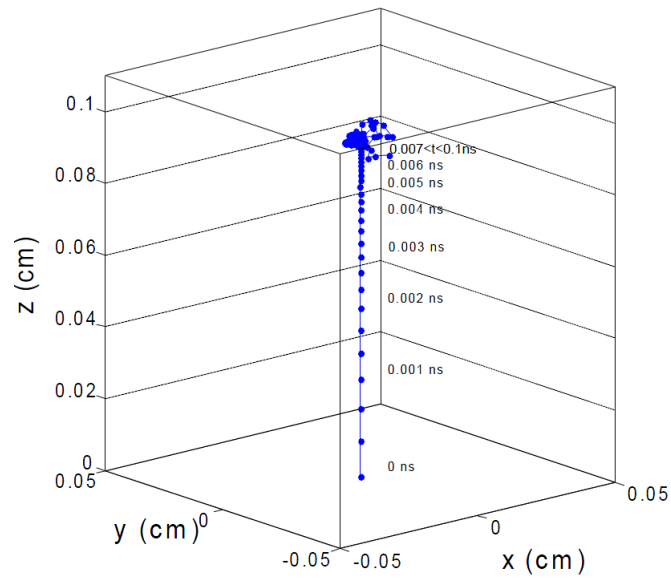


FIGURE 1.6 – Position moyenne des photons en fonction du temps dans un milieu homogène infini.

1.3 Imagerie moléculaire

1.3.1 Généralités et description de la méthode

Depuis quelques années, les techniques d'imagerie de fluorescence font l'objet d'une attention particulière^[26, 27, 28, 29]. Ceci est dû à la mise à disposition récente de marqueurs fluorescents^[30, 31, 32] qui permettent d'étudier de manière non invasive l'expression de gènes, les fonctions des protéines, les interactions entre protéines, et un nombre important de processus cellulaires.

Une des approches possibles pour faire de l'imagerie de fluorescence est la tomographie optique diffuse de fluorescence^[33, 34, 35] (abrégée FDOT pour *Fluorescence Diffuse Optical Tomography*). Cette technique a pour objectif la reconstruction en trois dimensions de la localisation des fluorophores dans le milieu étudié. De même que pour la tomographie à rayons X, cette méthode consiste à illuminer le milieu à plusieurs endroits différents et à récupérer le signal issu du milieu sur plusieurs détecteurs. On utilise ensuite un modèle mathématique décrivant la propagation des photons au sein du milieu afin d'obtenir la représentation tridimensionnelle de la fluorescence dans l'objet d'étude. La particularité de la FDOT par rapport aux autres techniques de tomographie utilisant des rayonnements à haute énergie (comme la tomodensitométrie à rayons X^[36] ou la tomographie par émission de positons^[37]) vient du fait que les photons sont très fortement diffusés par les tissus.

On donne à titre d'exemple sur la figure 1.7 un système de tomographie FDOT ainsi qu'un exemple d'image obtenue.



FIGURE 1.7 – A gauche : Exemple de système de FDOT ; A droite : Exemple de reconstruction 3D obtenue en FDOT (Institut Albert Bonniot, acquisition sur Tomofluo3D, CEA).

Il est ainsi possible d'observer et de quantifier les phénomènes d'intérêt grâce aux marqueurs fluorescents avec une résolution de l'ordre du millimètre. La FDOT est aussi intéressante par rapport aux autres techniques comme l'imagerie par résonance magnétique et la

tomodensitométrie car les doses injectées d'agents de contrastes sont respectivement 700 et 5 600 fois moins importantes^[38].

Les techniques de tomographie peuvent être implémentées de trois manières différentes : l'illumination peut être continue^[39], résolue en temps^[40], ou bien résolue en fréquence^[41].

La première implémentation utilise une source de lumière et un détecteur continu et compare des différences d'intensité lumineuse. L'approche résolue en temps repose sur une illumination pulsée (les pulses de lumière étant généralement plus rapides que 100 ps) et consiste à étudier l'élargissement temporel du pulse en sortie du milieu diffusant par le biais d'un détecteur résolu en temps comme une caméra à crénelage temporel, des photomultiplicateurs ou des systèmes de comptage de photons. L'approche fréquentielle consiste quant à elle à moduler la lumière incidente et à mesurer l'intensité modulée ainsi que la phase en sortie du milieu.

Le contenu informationnel pour les approches temporelles et fréquentielles est potentiellement plus important que pour l'approche continue, les mesures à toutes les fréquences apportant en théorie autant d'informations que la distribution complète des temps de vol des photons. Les instruments résolus en temps sont toutefois très sensibles aux faibles nombres de photons.

Bien que les techniques tomographiques permettent d'avoir une représentation tridimensionnelle de la fluorescence ainsi qu'une vraie quantification du contraste optique même en profondeur, les techniques d'illumination planaire^[42, 43] sont préférées pour les applications cliniques où une instrumentation robuste, des acquisitions en temps réel et un large champ sont requis.

Cette technique consiste à illuminer le milieu avec une source étendue et à détecter le signal sortant du milieu avec un détecteur tel qu'une caméra CCD. Ceci peut se faire soit en transmission, où l'on illumine l'objet d'un côté et où la détection se fait du côté opposé, soit en rétrodiffusion, où l'on réalise l'illumination et la détection du même côté de l'objet.

L'approche en transmission peut être utile par exemple dans le cas de l'imagerie du petit animal, où les distances à traverser par la lumière sont de l'ordre du centimètre. Cependant, dans le cas de l'Homme, on peut avoir plusieurs centimètres à traverser, il devient alors plus intéressant d'utiliser une géométrie en rétrodiffusion (abrégée FRI pour *Fluorescence Reflectance Imaging*) puisqu'on dispose alors d'une implémentation plus simple au niveau instrumental autorisant même des sondes portables.

Les techniques de FRI présentent plusieurs avantages. Offrant une bonne sensibilité lorsque les objets à étudier sont proches de la surface, ce sont des techniques en général rapides (le temps d'acquisition typique étant inférieur à la seconde, permettant ainsi un cadencement vidéo), leur implémentation est simple et peu coûteuse, et l'encombrement est faible.

On donne sur la figure 1.8 un exemple de sonde FRI utilisable en chirurgie peropératoire ainsi qu'un exemple d'image obtenue avec cette même sonde.

On comprendra facilement avec cet exemple l'avantage des techniques de FRI par rapport

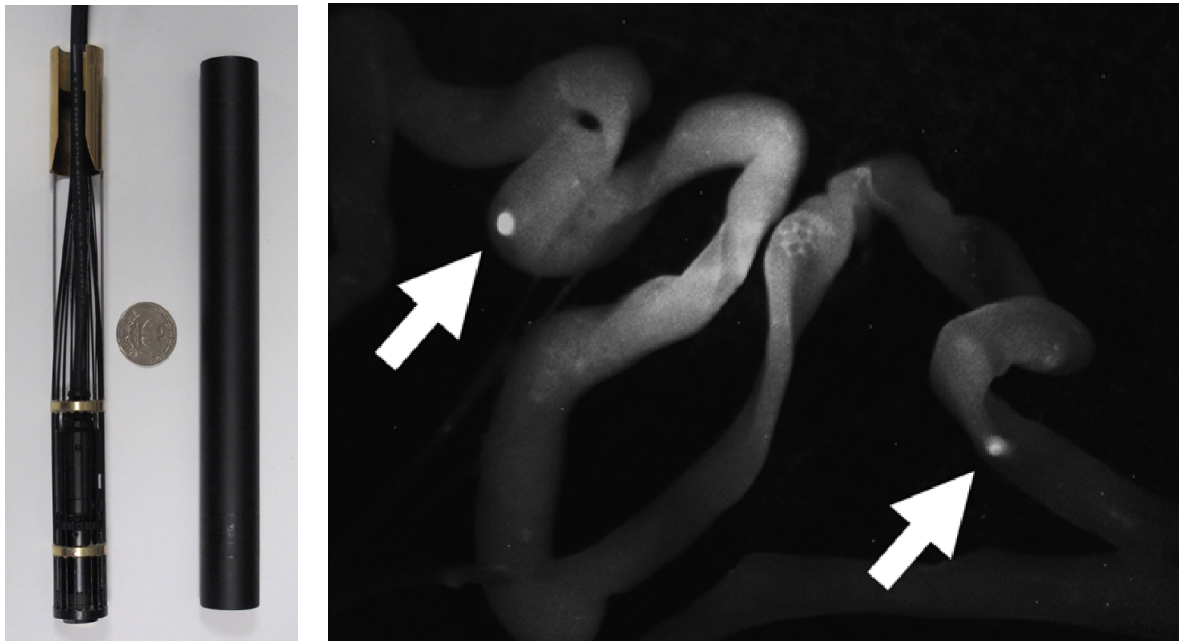


FIGURE 1.8 – **A gauche : Sonde FluoSTIC^[43]; A droite : Exemple d'image de fluorescence obtenue en *in vivo* lors d'une détection et excision guidées de nodules dans la cavité péritonéale d'une souris (les nodules sont pointés par les flèches blanches).**

aux techniques de FDOT en termes d'encombrement. On voit toutefois aussi les compromis à faire en termes de performances : seule une représentation topographique est possible, et, bien que sur l'image de fluorescence, les nodules aient un niveau de signal important, le signal de fond a lui aussi un niveau non négligeable.

Ceci illustre la première des deux limites fortes auxquelles on est confronté en FRI : la pénétration des tissus reste relativement faible (quelques millimètres seulement) car les signaux détectés décroissent rapidement avec la profondeur tandis que le bruit de fond reste constant (ce bruit de fond pouvant être causé par la fluorescence des couches superficielles et par les fuites d'excitation).

L'autre limite est l'impossibilité d'avoir une information quantitative. En effet, une faible concentration de fluorophores proche de la surface et une forte concentration de fluorophores en profondeur pourront avoir la même apparence à cause de la diffusion de la lumière par les tissus.

Comme nous allons le voir par la suite, le fait d'utiliser le domaine spectral du proche infrarouge permet de réduire en partie ces limites, mais cela n'est pas suffisant pour avoir des performances comparables à la FDOT.

Il existe donc plusieurs paramètres à prendre en compte afin d'optimiser les signaux en imagerie *in vivo* dans le proche infrarouge.

D'une part, on aura les paramètres d'ordre physico-chimiques qui concerneront aussi bien le fluorophore que la cible et les tissus environnants. Pour le fluorophore, il faut tenir compte de sa solubilité en milieu aqueux, mais aussi de ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission, de son coefficient d'extinction, de son rendement quantique et des effets de l'environnement local sur ces propriétés. Au niveau du ciblage des cellules, les propriétés importantes sont l'indice de réfraction de la cible et des tissus, la diffusion des tissus et leur absorption à la longueur d'onde d'excitation, leur autofluorescence ainsi que les barrières de diffusions cellulaires et subcellulaires. L'évacuation du fluorophore depuis le sang est bien sûr un paramètre primordial.

D'autre part, on aura des paramètres liés au système d'illumination et de détection de la fluorescence. Concernant l'illumination, il faudra s'intéresser à la fluence et à l'homogénéité de l'excitation ainsi qu'au photoblanchiment du fluorophore, tandis que pour la détection il faudra tenir compte du filtrage, de la transmission des optiques dans le proche infrarouge, et de la sensibilité et de la réponse spectrale du détecteur.

Les principaux paramètres ayant trait aux marqueurs fluorescents vont être expliqués plus en détail dans le paragraphe suivant, nous reviendrons sur les aspects liés au système expérimental dans le chapitre 3.

1.3.2 Marqueurs

Les marqueurs fluorescents (aussi appelés fluorophores ou agents de contraste) peuvent être classés selon deux catégories selon qu'ils sont endogènes ou bien exogènes. On parle de marqueur endogène dans le cas où celui-ci est généré par le tissu biologique lui-même, et de marqueur exogène dans le cas où l'on va injecter un corps étranger au tissu.

Comme nous le préciserons dans le paragraphe sur l'autofluorescence, les marqueurs endogènes ont une fluorescence relativement négligeable dans le domaine spectral du proche infrarouge qui nous intéresse et ne sont donc pas exploitables en tant que signal d'intérêt.

Les fluorophores utilisés en imagerie moléculaire sont donc en général des fluorophores exogènes organiques, principalement de la famille des indocyanines. L'utilisation aux Etats-Unis de l'*Indocyanine Green* (ICG)^[44] a été autorisée par la *Food and Drug Administration* (FDA) depuis 1958. Ce fluorophore peut être utilisé par exemple pour des examens comme les angiographies ou bien l'imagerie vasculaire du cerveau. Toutefois, en France, c'est l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) qui régule l'utilisation des marqueurs. Concernant l'ICG, celui-ci est utilisable depuis 2003 en utilisation intra-veineuse directe uniquement. La procédure conduisant à l'autorisation d'utilisation d'un marqueur peut être longue et coûteuse, ce qui peut donc être un frein au développement du marquage fluorescent malgré ses nombreux avantages.

Le nombre de fluorophores envisageables pour cibler les processus moléculaires est toutefois considérable, un grand nombre étant répertorié dans le catalogue *Molecular Probes*^[44]. De plus, il a été montré dans une étude de toxicité récente effectuée sur les principaux fluorophores utilisés en recherche que les doses envisagées pour réaliser de l'imagerie de fluorescence *in vivo* sont très inférieures aux doses toxiques données dans la littérature, ce qui est encourageant.

Parmi les fluorophores exogènes, on va pouvoir faire la distinction entre les marqueurs spécifiques et les marqueurs non-spécifiques. Les marqueurs spécifiques sont des fluorophores que l'on a associés à des ligands qui vont aider le couple ligand-fluorophore à se fixer sur la cible conjuguée du ligand. Dans le cas des marqueurs non-spécifiques, il pourra tout de même y avoir un ciblage passif de la zone tumorale par le fluorophore. Ce ciblage est dû à l'effet EPR (pour *Enhanced Permeability and Retention*). Cet effet est illustré sur la figure 1.9.

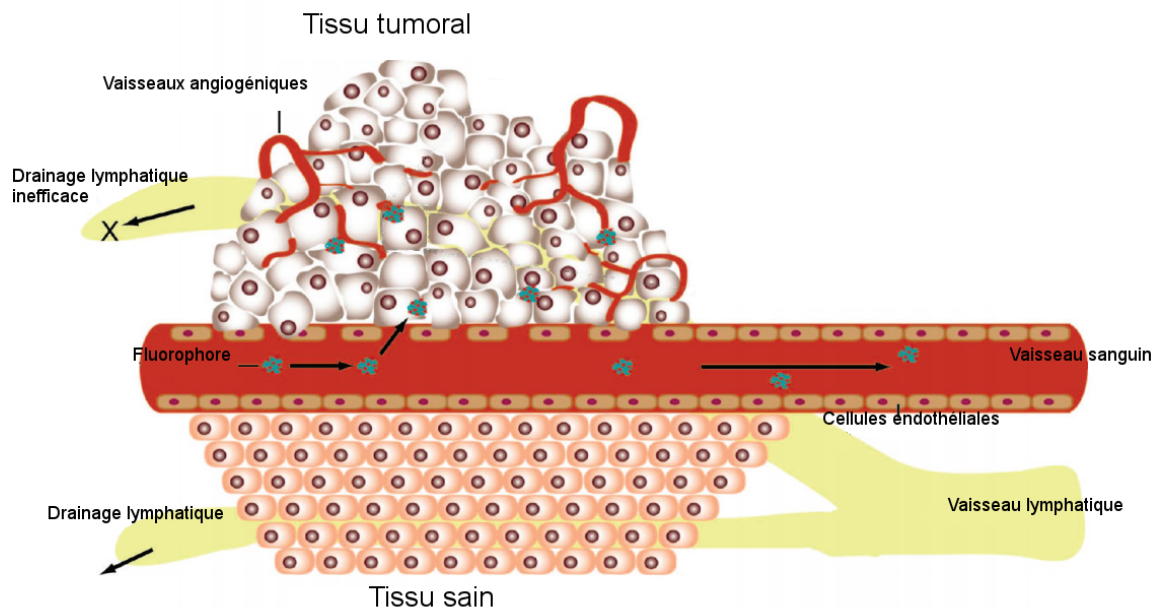


FIGURE 1.9 – Illustration de l'effet EPR (adapté de [45]).

Dans les tissus tumoraux, les macromolécules s'accumulent plus que dans les tissus sains : l'espacement plus large des cellules endothéliales (de l'ordre de 40 à 80 nm et pouvant aller jusqu'à 1 μm pour les tissus cancéreux, contre 2 à 6 nm pour les tissus sains) et la néovascularisation rapide et plus perméable entraînent une rétention plus importante des photoproduits. De plus, le système lymphatique au voisinage des tumeurs est défectueux voire inexistant, empêchant ainsi toute élimination des macromolécules par ce biais. Cet effet EPR s'observe par exemple dans le cas de l'ICG qui forme des macromolécules après injection en se liant aux protéines du sérum.

Dans les deux cas, on aura cependant toujours des cas de non spécificité : une concentration non négligeable de fluorophore ne sera pas fixée à la cible et diffusera dans le sang ou divers organes, entraînant la présence d'un signal de fond venant perturber la mesure. Le ratio d'intensités entre le signal moyen au niveau de la cible et le signal de fond peut varier entre 3 (pour un marqueur non spécifique) et 15 (pour les marqueurs les plus spécifiques)^[46].

Pour résoudre le problème de non-spécificité, la piste la plus intéressante se trouve dans les marqueurs activables. Ce type de marqueurs ne fluoresce qu'à partir du moment où il est fixé sur sa cible. Plusieurs voies ont été étudiées pour inhiber la fluorescence des marqueurs non ciblés^[32, 47, 48], les ratios pouvant alors atteindre 180. Si certains de ces résultats n'ont été obtenus qu'en *in vitro* et dans la région visible du spectre, ils sont les prémices d'une

nouvelle génération de marqueurs pouvant fortement améliorer la détection et la localisation en profondeur.

Il subsiste toutefois plusieurs limites. Tout d'abord, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission dépendent de la structure chimique des marqueurs. Il est donc difficile de modifier ces longueurs d'onde pour optimiser à loisir les signaux en fonction des applications, et, même lorsqu'il est possible de faire une modification, les changements apportés restent minimes. Ensuite, le rendement de fluorescence de ces marqueurs est en général relativement faible (inférieur à 15% en environnement aqueux). Ce problème de manque de signal est accentué par le fait qu'il n'y ait qu'un ligand par fluorophore. La détection reste donc très dépendante de la concentration des cibles. Enfin, ce type de fluorophore est très sensible au photoblanchiment, c'est-à-dire la perte de fluorescence due à une trop forte exposition à la lumière d'excitation.

Le passage aux quantum dots^[49] (nanocristaux semiconducteurs fluorescents inorganiques) pourrait résoudre plusieurs de ces problèmes. En effet, la longueur d'onde d'émission de ces espèces est paramétrable de façon très fine, et l'absorption de la longueur d'onde d'excitation se fait sur une large bande spectrale. Un autre avantage des quantum dots est leur bonne résistance au photoblanchiment. Par rapport au faible signal de fluorescence observé avec les marqueurs organiques, les quantum dots permettent d'avoir une douzaine de molécules cibles conjuguées, et ils possèdent un haut rendement quantique (90% en solvant organique, 60% en environnement aqueux).

Pour optimiser la détection des éléments ciblés, il est donc nécessaire d'avoir un marqueur qui se lie à la cible et reste en contact pendant que les marqueurs non accrochés sont éliminés. La taille des quantum dots poserait donc un problème s'ils étaient utilisés. En effet, ceux-ci sont relativement gros (entre 3-20 nm), et leur évacuation est donc difficile, le filtrage rénal perdant de son efficacité pour des particules de plus de 3,5 nm. La conséquence directe de cette mauvaise évacuation est la présence de marqueurs à des endroits non ciblés qui entraîne une fluorescence non spécifique augmentant le signal de fond parasite.

Le principal obstacle pour les quantum dots reste toutefois leur toxicité. Ceux-ci sont en effet faits à partir de métaux toxiques sous leurs formes élémentaires (par exemple le cadmium, l'arsenic et le plomb). Sous forme nanocristalline ils pourraient cependant être relativement inertes. Leur toxicité réelle reste donc à déterminer.

1.4 Signaux parasites et méthodes d'élimination existantes

1.4.1 Autofluorescence

L'autofluorescence désigne la fluorescence des tissus due aux fluorophores endogènes dont les spectres de fluorescence sont présentés sur la figure 1.10. Cette figure illustre l'intérêt d'utiliser une longueur d'onde dans le proche infrarouge. En effet, passé 650 nm, seules les porphyrines présentent encore une fluorescence qui pourrait venir parasiter les autres signaux. Cette fluorescence parasite est toutefois bien moins importante que celle qui serait observée dans le domaine de l'ultraviolet ou du visible où les fluorophores endogènes sont plus présents.

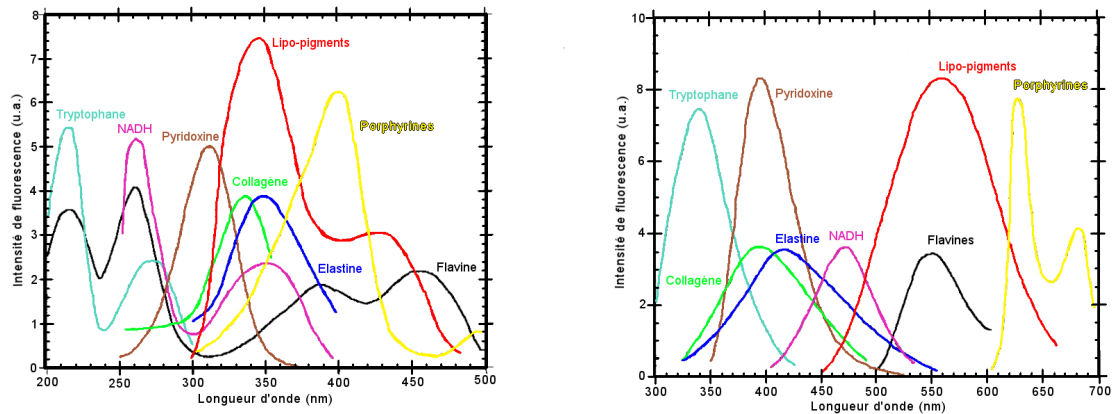


FIGURE 1.10 – Spectres d’absorption (à gauche) et d’émission (à droite) des principaux fluorophores endogènes présents dans les tissus vivants^[50].

Ce signal d’auto fluorescence peut être utilisé pour suivre certaines maladies (par exemple en utilisant l’auto fluorescence en excitant dans l’ultraviolet ou le bleu et en détectant l’émission dans le vert ^[51] ou bien l’auto fluorescence dans le proche infrarouge en excitant dans le vert^[52, 53]). On l’utilise par exemple dans le proche infrarouge pour imager des mélanomes^[54]. Récemment^[55], l’auto fluorescence dans le proche infrarouge en excitant à 785 nm a été exploitée pour détecter des tumeurs cancéreuses dans le colon. Dans le cas de l’imagerie moléculaire dans le proche infrarouge, l’auto fluorescence des tissus n’est plus un signal d’intérêt mais devient au contraire un signal parasite. Celui-ci reste relativement faible dans notre gamme spectrale, mais il peut devenir problématique quand le signal à observer est en profondeur.

Comme on peut le voir sur la figure 1.10, il n’est pas censé y avoir de sources de fluorescence endogène dans le proche infrarouge. La principale hypothèse concernant la cause de l’auto fluorescence observée est le régime alimentaire, l’auto fluorescence étant alors due à la fluorescence de la chlorophylle^[56]. Cependant, même avec un régime purifié, il existe une auto fluorescence résiduelle dont la source reste à ce jour inconnue.

Il existe plusieurs méthodes pour s’affranchir de l’auto fluorescence, celles-ci étant principalement des méthodes spectrales qui consistent à faire des acquisitions de l’objet étudié dans plusieurs bandes spectrales pour obtenir un cube de données spectrales pour chacun des points de l’image, puis à utiliser des techniques de séparation de sources pour mettre en évidence la contribution de l’auto fluorescence et ainsi la corriger.

On peut ainsi citer le système de Carestream Health^[57] qui utilise plusieurs longueurs d’onde d’excitation comprises entre 390 et 770 nm ainsi que des longueurs d’onde d’émission comprises entre 440 et 830 nm. Les différents spectres d’excitation et d’émission de fluorescence sont ensuite modélisés pour réaliser la séparation des spectres de fluorescence spécifique et d’auto fluorescence.

De manière similaire, on peut trouver le système Maestro de l’équipe d’imagerie moléculaire de Cambridge Research and Instrumentation (CRI)^[58]. Là aussi la suppression de

l'autofluorescence repose sur une illumination à plusieurs longueurs d'onde et une détection dans différentes bandes spectrales. En partant du principe que les spectres de fluorescence s'additionnent de manière linéaire, il est possible de s'affranchir du signal d'autofluorescence si l'on connaît le spectre du fluorophore utilisé.

Enfin, on peut citer le système IVIS du groupe Caliper Life Sciences^[59]. Dans ce cas, les mesures de fluorescence acquises aux différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont décomposées en matrices de concentration de composants C et en matrices de spectres S . L'algorithme utilisé permet ensuite de faire la séparation des spectres d'autofluorescence et de fluorescence des différents fluorophores utilisés. Il est toutefois nécessaire d'initialiser les matrices C et S et de fixer le nombre de sources fluorescentes recherchées.

Une autre méthode de réduction de l'autofluorescence s'appuie sur le fait qu'il est possible d'exciter ce signal parasite sur une gamme de longueurs d'onde plus large que les spectres d'absorption des fluorophores usuels. Ainsi, on peut utiliser deux longueurs d'ondes, l'une excitant fortement la fluorescence d'intérêt mais aussi l'autofluorescence, et une deuxième n'excitant que l'autofluorescence^[60, 61, 62]. Les spectres de l'autofluorescence étant les mêmes pour les deux longueurs d'onde, son influence peut ainsi être amoindrie en faisant la soustraction des deux signaux de fluorescence.

L'autofluorescence peut aussi être supprimée en modélisant son signal à partir de l'approximation de la diffusion pour soustraire sa contribution à des mesures tomographiques^[34]. L'hypothèse de départ est que l'autofluorescence a une distribution homogène, le signal total récupéré étant alors une combinaison linéaire entre cette contribution homogène et une contribution hétérogène correspondant au signal de fluorescence d'intérêt. En modélisant ce signal total à partir de l'approximation de la diffusion et en utilisant une normalisation par le ratio de Born (division des mesures de fluorescence par les mesures correspondantes à la longueur d'onde d'excitation pour prendre en compte les variations de propriétés optiques et les facteurs de gain du système optique), il est ensuite possible d'utiliser trois techniques de soustraction de l'autofluorescence. La première technique tient compte de l'hypothèse d'uniformité du signal d'autofluorescence. Il est alors possible d'obtenir une approximation satisfaisante de ce signal à soustraire en prenant la moyenne du signal de fluorescence reconstruit. La deuxième technique repose sur une modélisation des mesures expérimentales avec l'expression analytique du ratio de Born pour un milieu fluorescent homogène et une soustraction des valeurs prédites aux mesures expérimentales. Enfin, la troisième technique est une variation de la précédente qui prend en compte les biais expérimentaux qui peuvent entraîner des différences entre le ratio de Born mesuré et sa prédiction théorique.

Enfin, il existe d'autres méthodes de suppression de l'autofluorescence qui peuvent par exemple s'appuyer sur le photoblanchiment des tissus (en illuminant ceux-ci préalablement à l'observation de la fluorescence d'intérêt, on peut réduire fortement le niveau d'autofluorescence)^[63], ou encore sur les propriétés des fluorophores (avec des décalages de Stokes plus grands^[64, 65], ou des temps de vie plus longs^[66]).

On comprendra donc qu'il n'existe encore aucune technique de réduction de l'autofluorescence reposant uniquement sur les géométries d'illumination et de détection qui serait comparable à la technique que nous proposons.

1.4.2 Fluorescence non spécifique

On désigne par fluorescence non spécifique le signal de fluorescence parasite dû aux marqueurs non fixés sur les cibles biologiques et créant un bruit de fond et des faux positifs. Dans ce cas, les techniques utilisées pour réduire l'auto fluorescence ne sont pour la plupart plus applicables, le signal d'intérêt et le signal dont on veut s'affranchir étant les mêmes. Pour ce type de signal parasite, ce sont plutôt des pistes biologiques qui sont explorées, notamment celle des marqueurs activables^[32] : ces marqueurs ont la particularité de posséder des molécules connectées qui inhibent la fluorescence. Après protéolyse, la molécule se détache et le marqueur fluoresce. On n'observe ainsi de la fluorescence que si le marqueur s'est effectivement fixé sur la cible, les marqueurs non fixés mais non évacués par l'organisme ne produisant pas de signal.

Une piste pour s'affranchir de cette fluorescence non-spécifique de manière optique serait d'étudier le comportement de la fluorescence en fonction de l'environnement du fluorophore, celui-ci pouvant subir des décalages en longueur d'onde d'émission ou bien des changements de rendement de fluorescence^[67].

Comme nous le verrons plus en détail dans les prochains chapitre, la technique que nous proposons ne repose pas sur des différences spectrales entre le signal parasite et le signal d'intérêt. Elle serait donc aussi bien adaptée à l'auto fluorescence qu'à la fluorescence non-spécifique.

1.4.3 Fuites d'excitation

La détection précise de la fluorescence est limitée par le niveau de bruit introduit par les fuites d'excitation à travers les filtres optiques. Ces fuites d'excitation apparaissent notamment lorsque la séparation entre la longueur d'onde d'excitation et celle d'émission (le décalage de Stokes) est faible.

La plupart du temps les filtres utilisés dans le proche infrarouge sont des filtres interférentiels passe-bande ou réjecteurs de bande ^[32]. Le problème de ce type de filtres est que leurs performances sont fortement dépendantes de l'angle d'incidence de la lumière ^[68]. En effet, lorsque l'angle d'incidence augmente, la courbe de transmission va se décaler vers les longueurs d'onde plus courtes. Comme la majorité des systèmes d'imagerie ne collimatent pas la lumière de manière à avoir l'incidence normale nécessaire au bon fonctionnement des filtres, on aura alors des fuites d'excitation plus importantes puisque les longueurs d'ondes d'excitation seront bloquées de manière moins efficace.

Seule une conception optimale de l'instrument et de son système de filtrage peut donc permettre de réduire au maximum les effets de ce signal parasite.

1.4.4 Absorption du milieu

L'absorption du milieu peut aussi être considérée comme un signal parasite. En effet, comme on l'a dit lors de la description générale de l'imagerie moléculaire, une des principales limites de la méthode est l'impossibilité d'obtenir une information quantitative : pour deux zones fluorescentes de même taille et de même concentration de fluorophores, si les milieux environnants ont des absorptions différentes (par exemple à cause d'un vaisseau sanguin proche, ou pour une concentration d'hémoglobine plus élevée), les signaux mesurés seront différents. L'objectif serait donc de s'affranchir de ces différences pour ne pas induire en erreur les analyses et l'observateur.

Il existe d'ores et déjà certaines solutions pour diminuer les effets de l'absorption^[69, 70, 71]. Ces méthodes peuvent se classer dans trois catégories. On parlera de techniques empiriques lorsque la correction se fait à partir du signal de fluorescence que l'on mesurerait sans influence des propriétés optiques. Les techniques reposant sur les systèmes de mesure consistent quant à elles à sélectionner les photons de fluorescence les moins atténués. Enfin, les techniques reposant sur la théorie relient par des méthodes calculatoires les mesures à la fluorescence théorique non affectée par les propriétés optiques.

Parmi les techniques empiriques, nombre d'entre elles utilisent le signal de réflectance à la longueur d'onde d'excitation pour réaliser la correction de l'absorption. Les premières méthodes de correction consistaient à faire la soustraction du signal d'excitation au signal de fluorescence^[72, 73]. Cette façon de procéder souffrait toutefois de limites fortes et n'était valide que dans certains cas particuliers. Par la suite, la correction a été réalisée en faisant le ratio de la fluorescence par l'excitation^[74, 75, 76]. Si cette technique est plus rigoureuse que la technique de la soustraction, elle ne prend cependant pas en compte les variations des propriétés optiques entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission.

Dans le cas de système fibrés, il est aussi possible de tirer parti de la réflectance résolue spatialement^[77, 78]. Certaines études ont en effet montré que l'on pouvait trouver des distances sources-détecteurs optimales pour lesquelles le ratio entre la fluorescence et l'excitation n'était que très peu impacté par les variations des propriétés optiques, permettant ainsi une quantification de la fluorescence mesurée. La limite de ces études est que les distances optimales en question ne peuvent être obtenues qu'expérimentalement, aucune justification théorique simple n'ayant pu être obtenue.

Alternativement au signal d'excitation, certaines équipes ont suggéré l'utilisation de la fluorescence avec une deuxième longueur d'onde d'émission^[79] ou bien la fluorescence endogène observée sans fluorophore^[80]. En sélectionnant les longueurs d'onde de manière à avoir une absorption comparable, le ratio des deux signaux de fluorescence permet alors de s'affranchir des effets des hétérogénéités d'absorption.

Les techniques reposant sur les systèmes de mesure ont pour principe de détecter de manière sélective les photons de fluorescence ayant parcouru un trajet suffisamment court au sein des tissus pour n'avoir subi qu'un faible nombre d'interactions. Ces méthodes peuvent utiliser des systèmes confocaux^[81], des systèmes fibrés^[82], ou bien des systèmes détectant uniquement la fraction de la fluorescence conservant la polarisation de la lumière d'excitation^[83]. Le

problème de ces techniques réside dans la taille de la zone sondée qui est relativement faible comparativement aux techniques de mesure classiques.

Enfin, les techniques reposant sur la théorie s'appuient sur plusieurs approximations de l'équation de transfert radiatif pour pouvoir la résoudre et ainsi proposer une modélisation de la fluorescence au sein des tissus. Ces approximations sont la loi de Beer-Lambert modifiée^[84], la théorie de Kubelka-Munk^[85], et l'approximation de la diffusion^[86, 87].

L'application de ces approximations n'est toutefois possible que sous certaines hypothèses. Par exemple, la loi de Beer-Lambert modifiée n'est valide que lorsqu'on considère que la couche de sang considérée est fine ($< 100 \mu\text{m}$). De plus, il est aussi nécessaire de connaître les rendements quantiques de fluorescence des fluorophores. Le fait que ceux-ci soient différents *in vitro* et *in vivo* est sûrement source d'erreur. Concernant la théorie de Kubelka-Munk, celle-ci impose de déterminer les spectres de fluorescence à la fois en réflexion et en transmission. Ceci limite donc fortement les applications possibles de cette méthode. Enfin, l'approximation de la diffusion n'est valide que dans les cas présentés précédemment.

Chacune de ces techniques a donc ses propres avantages et inconvénients qui les empêchent d'être utilisable pour toutes les applications. Nous verrons dans la suite de ce manuscrit qu'une des méthodes de traitement que nous proposons pour réduire les effets de l'autofluorescence permet aussi de corriger partiellement les effets des hétérogénéités d'absorption.

1.5 Problématique posée et solution proposée

Si l'on fait la synthèse de ce premier chapitre, on comprendra que les deux points prioritaires à améliorer en imagerie moléculaire sont le contraste entre la cible marquée et le reste du tissu ainsi que la résolution avec laquelle on va détecter la cible. En effet, le contraste observé va être réduit à cause des différents signaux parasites observés, cette réduction étant d'autant plus importante au fur et à mesure que les objets observés seront situés plus profondément au sein du milieu. La résolution quant à elle sera impactée par la diffusion des photons dans le milieu étudié.

Pour améliorer ces deux points, nous proposons une technique basée sur une illumination ligne plutôt que sur une illumination large champ plus classique. Le principe de notre méthode consiste à illuminer l'objet d'étude avec une ligne laser que l'on va balayer tout en faisant l'acquisition des images à chacune des positions de la ligne. Ainsi, nous obtenons une pile d'images contenant un nombre d'informations plus important que pour l'illumination large champ. Nous pouvons par la suite sélectionner des zones de détection spécifiques sur ces images qui vont nous permettre d'améliorer fortement le contraste et la résolution.

Notre objectif est d'utiliser une technique purement optique, contrairement aux techniques déjà existantes qui reposent sur des méthodes spectrales par exemple pour diminuer les signaux parasites^[57, 58, 59, 60, 61, 62].

Le reste de ce manuscrit va s'articuler de la façon suivante.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons en détail les différentes méthodes de détection auxquelles on a accès en utilisant l'illumination ligne et comment ces méthodes nous permettent d'améliorer le contraste et la résolution par rapport à une illumination uniforme. Nous exposerons, du point de vue théorique et expérimental, les trois axes que nous avons suivis. La première méthode est une détection localisée qui consiste à ne sélectionner qu'une bande de pixels unique sur chacune des images de la pile. La seconde méthode est une implémentation de la technique d'illumination structurée en faisant une modulation de la pile d'images. La troisième et dernière méthode repose sur l'utilisation des images acquises à la longueur d'onde d'excitation pour avoir un *a priori* sur le signal à retirer des images de fluorescence.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons le montage expérimental utilisé pour atteindre notre objectif d'amélioration de contraste et de résolution, ainsi que les fantômes utilisés afin de simuler les tissus nous permettant de valider les études faites dans le chapitre suivant.

Le chapitre 4 enfin montrera les résultats obtenus avec les méthodes présentées dans le chapitre 2 dans différents cas nous permettant de quantifier leurs apports en termes de contraste et de résolution. Nous présenterons tout d'abord l'amélioration de contraste obtenue sur un fantôme simple avec une inclusion fluorescente unique située à différentes profondeurs. Nous présenterons ensuite l'amélioration de résolution observée sur différents fantômes complexes avec plusieurs inclusions fluorescentes. Ces résultats sur fantômes seront présentés pour deux niveaux de signal parasite différent, l'un étant comparable à un cas *in vivo* classique, l'autre étant un cas extrême nous permettant de tester les limites de nos méthodes. Après ces résultats sur fantôme, nous présenterons des résultats obtenus en *in vivo* sur souris. Trois cas de difficultés croissantes seront décrits pour montrer l'intérêt de notre technique dans une situation réelle. Enfin, nous présenterons quelques résultats intéressants démontrant que nos méthodes permettent aussi de réaliser une correction partielle des hétérogénéités d'absorption et d'avoir des informations sur la profondeur des cibles fluorescentes considérées.

Méthodes envisagées pour l'amélioration du contraste et de la résolution spatiale

2.1 Etude préliminaire

Le principe de la méthode originellement envisagée est expliqué schématiquement aux figures 2.1 et 2.2.

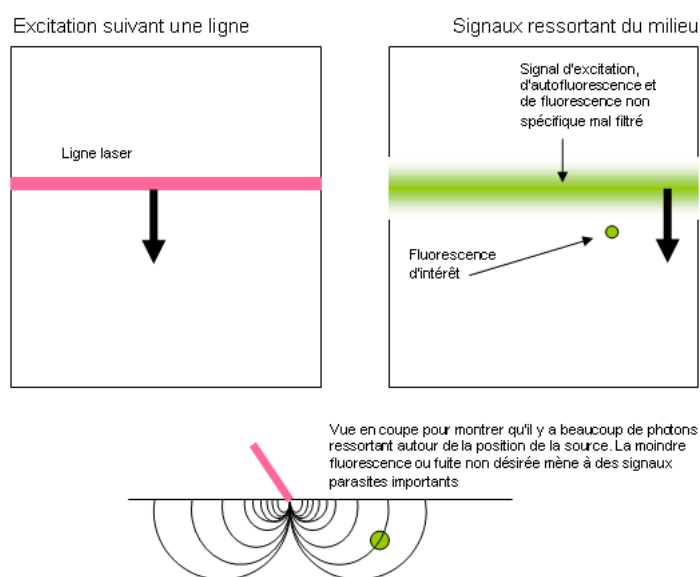


FIGURE 2.1 – Description schématique du comportement de la lumière lorsqu'on excite un échantillon avec une ligne laser.

L'hypothèse avait été faite que, lorsqu'on illumine un échantillon par le biais d'une ligne, la majeure partie des photons s'échappant du milieu se situe au niveau de la ligne d'excitation. Les signaux parasites devraient donc être localisés au niveau de la ligne, la fluorescence d'intérêt étant quant à elle excitée aux différentes positions de la ligne par les photons diffusés ayant parcouru un chemin plus grand. L'idée était donc d'illuminer par le biais d'une ligne que l'on viendrait ensuite masquer.

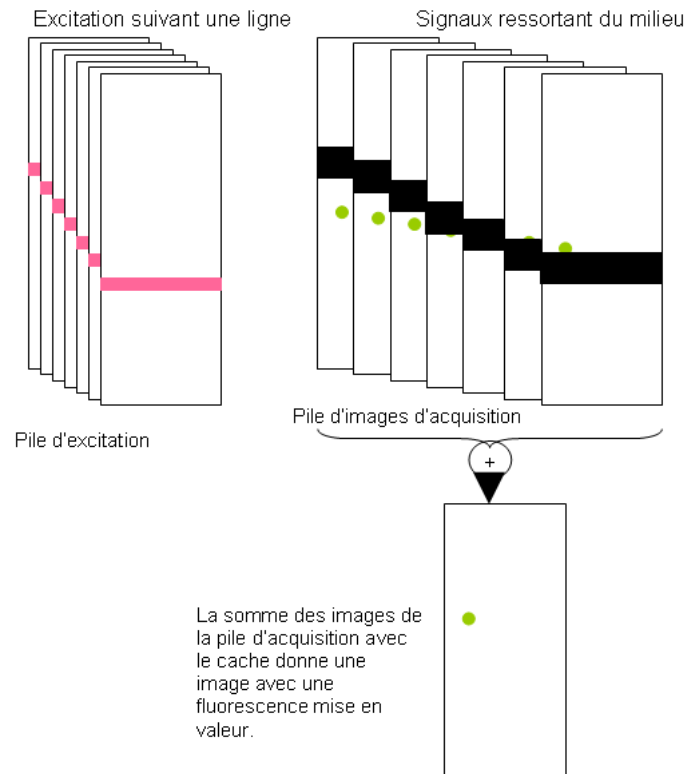


FIGURE 2.2 – Description schématique de la méthode permettant de retirer les signaux parasites localisés au niveau de la ligne d'excitation.

Nous avons cependant rapidement constaté que cette méthode n'avait pas le résultat escompté, la réduction du signal parasite étant faible et le contraste n'étant amélioré que de manière marginale. Nous avons donc décidé d'explorer d'autres pistes que celle du masquage de la ligne en conservant le principe général de la méthode. Il nous est en effet possible de réaliser différents traitements sur les images acquises en balayant la ligne, ces images étant porteuses d'un grand nombre d'informations. On peut classer ces traitements en deux catégories, selon qu'elles concernent des modifications au niveau de la détection ou bien au niveau de l'illumination.

Tout d'abord, il est possible de ne sélectionner que certaines parties des images éloignées plus ou moins de l'excitation pour faire ressortir la fluorescence d'intérêt en fonction de sa profondeur. En effet, au fur et à mesure que l'on détecte à des distances croissantes de l'excitation, on va être sensible à des photons qui auront fait un voyage plus long au sein du milieu et donc qui auront sondé des profondeurs plus grandes.

Ensuite, nous avons vu qu'il est possible d'implémenter la méthode d'illumination structurée à partir des images acquises et d'obtenir ainsi des résultats similaires à ceux qu'on aurait en illuminant le milieu avec une source modulée spatialement.

Enfin, nous avons émis l'hypothèse que l'on peut tirer parti du profil de la ligne d'excitation pour apporter un *a priori* sur le profil d'autofluorescence afin de minimiser les effets de celle-ci.

Dans la suite de ce document, on parlera de détection localisée pour tous les traitements consistant à sélectionner une partie seulement des images acquises pour faire la reconstitution de l'image globale. On parlera d'illumination structurée pour le traitement consistant à reproduire en post-traitement cette méthode d'illumination, même si nous continuerons à utiliser un simple balayage par ligne pour simuler cette méthode.

2.2 Formation de l'image en illumination uniforme

Pour quantifier les améliorations apportées par nos méthodes, nous avons besoin de les comparer aux images obtenues avec une illumination large champ uniforme utilisée de manière générale sur les systèmes existants. Pour être sûrs d'avoir un profil comparable entre les résultats obtenus par illumination uniforme et ceux obtenus par nos méthodes, nous avons décidé d'acquérir une image en illumination uniforme à partir de la somme de la pile d'images plutôt qu'avec une source d'illumination différente.

Pour comprendre le problème qu'il pourrait y avoir en prenant deux sources distinctes, on s'intéresse aux images présentées en figure 2.3.

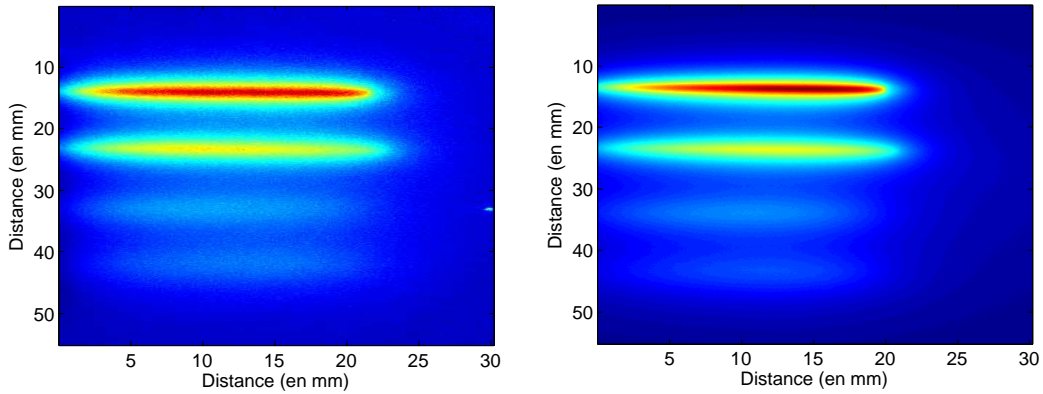


FIGURE 2.3 – Exemples d'images obtenues avec une véritable illumination uniforme (à gauche) et avec une somme d'images (à droite) sur un fantôme possédant des propriétés optiques proches de celles des tissus vivants dans lequel on a immergé quatre capillaires à des profondeurs croissantes du haut vers le bas ; les images ont été normalisées.

L'objet étudié est un fantôme possédant des propriétés optiques proches de celles des tissus vivants ($\mu_a = 0 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,9$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$) dans lequel on a immergé quatre capillaires à des profondeurs croissantes, le capillaire le plus proche de la surface se trouvant en haut de l'image (une description détaillée de ce fantôme sera présentée à la figure 3.6.c du chapitre 3). On peut voir, sur cette figure, une image prise avec une source illuminant un large champ (à gauche) et l'image obtenue après somme de la pile (à droite) comme nous le préconisons. L'image prise avec la source large champ a été corrigée à partir de l'image d'excitation afin de ne pas être influencé par la forme du profil de l'excitation. Dans les deux cas, on obtient un résultat similaire, les deux capillaires les plus proches de la surface sont les

mieux détectés. Le capillaire le plus profondément enfoui est quant à lui le moins bien détecté car son niveau de signal est très faible. On remarque cependant que l'image en illumination uniforme est plus bruitée (aspect granuleux de la surface dans les zones uniformes en couleur). L'image obtenue avec la somme de la pile d'images nous paraît plus lisse car elle a un temps d'intégration virtuellement plus long grâce à la sommation.

Pour mieux comparer les deux cas, on a tracé sur la figure 2.4, les profils d'intensité (pris perpendiculairement aux quatre capillaires) pour l'image reconstituée avec la somme (courbe rouge) et l'image obtenue avec une véritable source large champ avant (courbe bleue) et après correction de l'excitation (courbe verte).

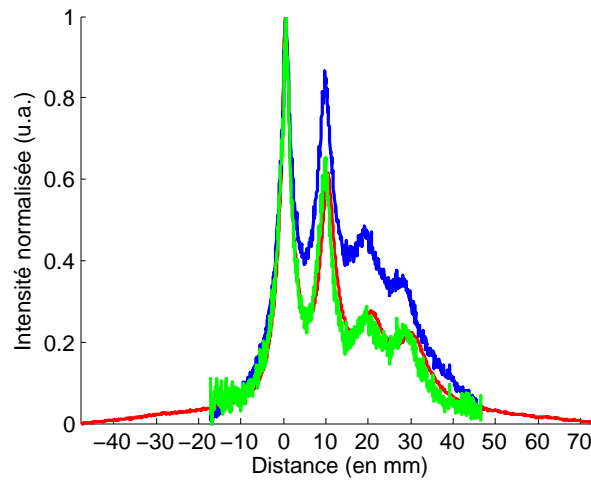


FIGURE 2.4 – **Comparaison des profils d'intensité : — véritable illumination uniforme, — somme d'images, — véritable illumination uniforme corrigée avec l'excitation.**

Avant correction, on remarque l'influence de la non homogénéité de l'excitation dans la mesure où trois pics sur quatre (excepté le premier pic proche de la surface) sont surévalués. Après correction, on retrouve des profils quasi identiques pour l'illumination homogène et pour la somme de la pile d'images. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, on remarque que le profil obtenu avec le balayage de la ligne est moins bruité que celui obtenu en illumination homogène (même avant correction).

Il est nécessaire d'être vigilant car la contrainte spatiale est importante et il faut prendre en compte le sens du balayage de la ligne. En effet, comme on peut le voir sur la figure 2.5, celle-ci n'a pas un profil homogène sur toute sa longueur : l'intensité varie peu au centre de la ligne (entre environ 15 et 35 mm sur la figure), et décroît sur les bords, l'intensité pouvant alors diminuer de 40%. Pour toutes nos expériences où l'objet fluorescent observé est suffisamment petit, cette non uniformité ne pose pas de problèmes. Il suffit en effet qu'il soit localisé au niveau de la zone homogène centrale de la ligne. Cependant, pour des objets complexes comme celui illustré en figure 2.3, des différences peuvent être observées en fonction du sens du balayage.

Sur la figure 2.6, on a représenté les profils d'intensité moyens obtenus à partir de quatre

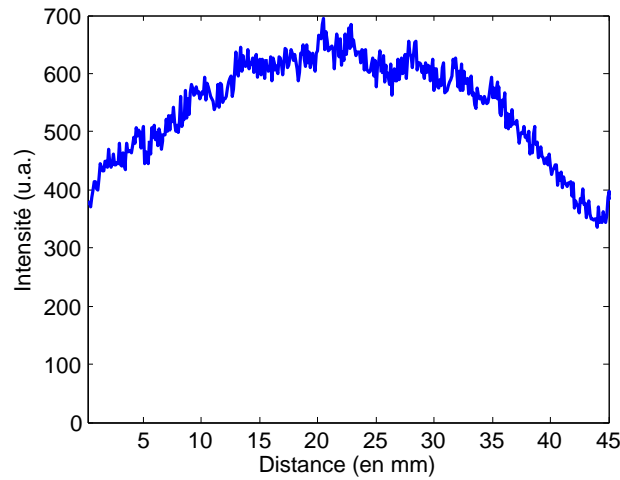


FIGURE 2.5 – Profil d'intensité de la ligne d'excitation.

expériences différentes pour des balayages parallèles (courbe bleue) et perpendiculaires (courbe rouge) aux capillaires, avant et après correction par le profil de la ligne. Les profils sont pris perpendiculairement aux quatre capillaires au niveau de leurs centres.

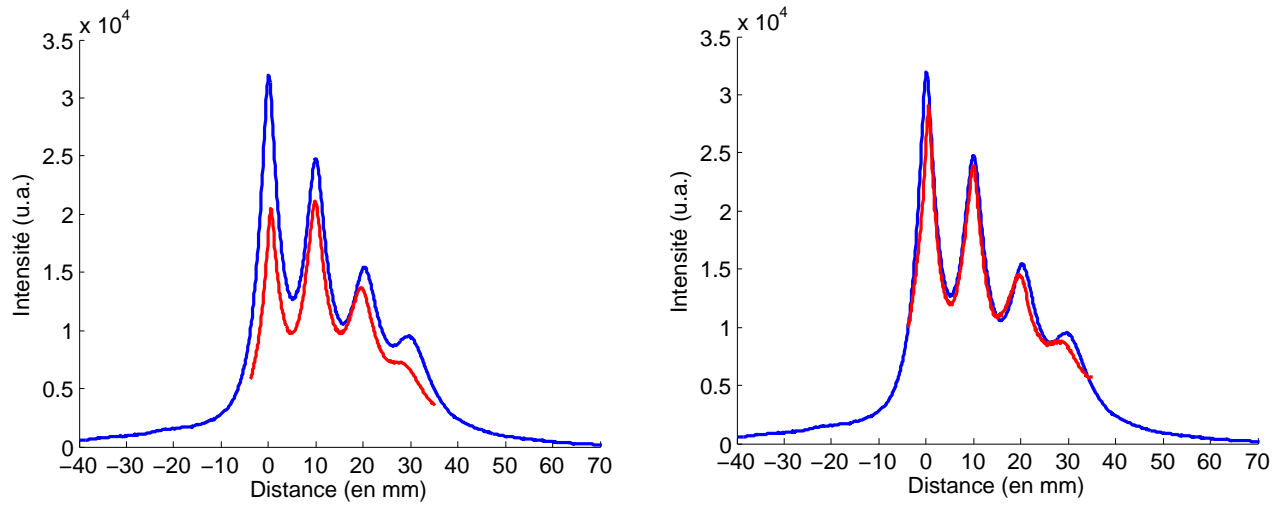


FIGURE 2.6 – Comparaison des profils d'intensité : — en balayage parallèle, — en balayage perpendiculaire avant (à gauche) et après (à droite) correction.

Avant correction, on constate que les profils d'intensité présentent des différences sur l'ensemble des distances mais marquées principalement au niveau du premier et du quatrième capillaire. Cette différence d'amplitude des pics est due à l'inhomogénéité de la ligne d'excitation laser : en effet, l'excitation a une intensité plus importante au centre et les capillaires sont donc moins excités aux extrémités. En utilisant le profil de la ligne, il est toutefois possible de corriger les images de manière à rehausser le signal. Ce faisant, on trouve alors des comportements comparables entre le balayage parallèle et le balayage perpendiculaire comme on peut le voir sur la partie droite de la figure 2.6.

2.3 Méthode de détection localisée

La première méthode proposée pour répondre aux objectifs de cette thèse (amélioration du contraste et de la résolution) va consister à ne conserver qu'une bande de pixels sur chacune des images de la pile pour former une image globale de l'objet par concaténation. Nous allons d'abord présenter l'apport théorique de cette méthode, puis nous expliquerons son implémentation expérimentale de manière plus détaillée par la suite.

2.3.1 Théorie et simulation

Pour démontrer l'intérêt de l'illumination par une ligne en comparaison avec une illumination uniforme classique, on s'intéresse à l'équation de l'approximation de la diffusion et à sa résolution pour deux géométries d'illumination (planaire et cylindrique).

Les géométries étudiées sont schématisées sur la figure 2.7 et les détails des calculs sont donnés en annexe A.

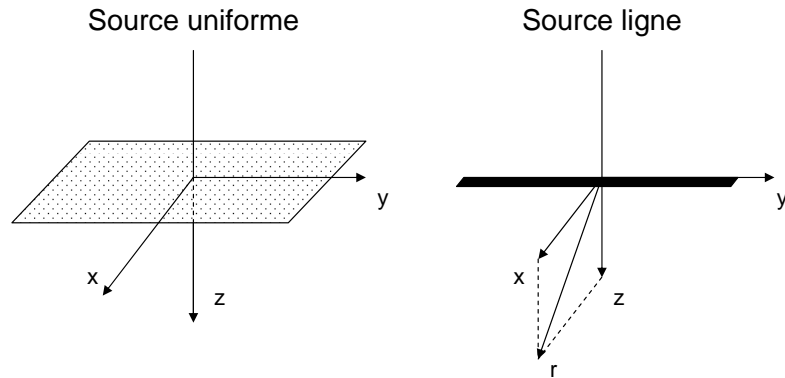


FIGURE 2.7 – Géométries étudiées : planaire dans le cas de l'illumination uniforme (à gauche), cylindrique dans le cas de l'illumination ligne (à droite) ; le point z indique un point d'observation pour la géométrie planaire et le vecteur r indique un point d'observation pour la géométrie cylindrique.

Pour une illumination uniforme en régime stationnaire dans un milieu homogène infini, la solution de l'équation de la diffusion s'écrit :

$$\phi(z) = \frac{S_0}{D} e^{-kz} \quad (2.1)$$

où S_0 est le terme source, $D = 1/(3\mu'_s)$ (en cm) est le coefficient de diffusion, et $k = [\mu_a/D]^{1/2}$ (en cm^{-1}) est le coefficient d'atténuation effectif.

Pour une illumination ligne, cette solution s'écrit quant à elle :

$$\phi(r) = \frac{S_0 K_0(kr)}{2\pi D} \quad (2.2)$$

où $K_0(x)$ est la fonction de Bessel modifiée de deuxième espèce à l'ordre 0.

Ayant les solutions analytiques pour l'illumination ligne et l'illumination uniforme, il est maintenant possible de simuler l'amélioration de la résolution obtenue en faisant une détection localisée. On se place dans un cas où l'on considère une inclusion fluorescente unique à différentes profondeurs z_f dans un milieu aux propriétés optiques proches de celles des tissus (comme représenté sur la figure 2.8, $\mu_a = 0 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,9$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$).

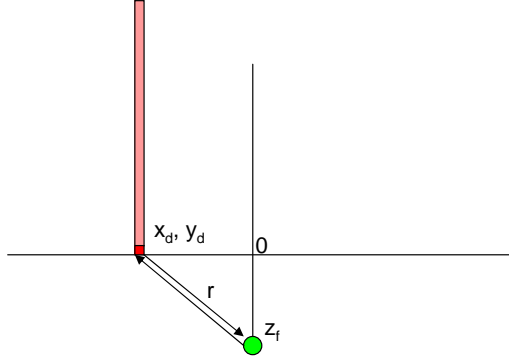


FIGURE 2.8 – Schéma descriptif de la géométrie étudiée en simulation pour comparer les résolutions en illumination uniforme et en détection localisée.

Les mesures de fluorescence se calculent alors de la manière suivante.

Pour l'illumination uniforme, on a :

$$\phi(x_d, y_d, z_f) = \frac{S_0}{D} e^{-kz_f} \quad (2.3)$$

La mesure M détectée au point (x_d, y_d) s'écrit quant à elle :

$$M(x_d, y_d, z_f) = \frac{S_0}{D} e^{-kz_f} \cdot e^{-k\sqrt{x_d^2 + y_d^2 + z_f^2}} \quad (2.4)$$

Et pour une illumination ligne le long de l'axe x avec détection localisée sur l'excitation on a :

$$\phi(x_d, y_d, z_f) = \frac{S_0 K_0(k\sqrt{x_d^2 + z_f^2})}{2\pi D} \quad (2.5)$$

$$M(x_d, y_d, z_f) = \frac{S_0 K_0(k\sqrt{x_d^2 + z_f^2})}{2\pi D} . e^{-k\sqrt{x_d^2 + y_d^2 + z_f^2}} \quad (2.6)$$

Sur la figure 2.9, on observe les variations de la largeur à mi-hauteur du signal obtenu avec ces formules pour des profondeurs comprises entre 0,1 mm et 1 cm. On voit clairement que la résolution est meilleure en faisant une détection localisée qu'avec l'illumination uniforme.

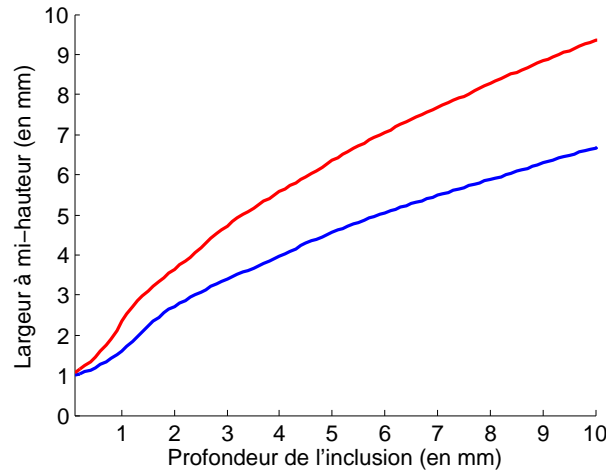


FIGURE 2.9 – Largeur à mi-hauteur dans le cas d'une illumination ligne détectée sur l'excitation (—) et dans le cas d'une illumination uniforme (—).

2.3.2 Détection localisée simple

Comme mentionné précédemment, cette méthode va consister à sélectionner une partie localisée de chacune des images acquises lors du balayage pour reconstituer une image globale de l'objet. On ne fait ainsi plus une somme des images totales mais une concaténation des différentes bandes sélectionnées sur chaque image. Pour avoir une image complète de l'objet à étudier, il est nécessaire de sélectionner une bande de pixels de la largeur adéquate. Cette largeur dépend de la résolution optique du système et de la taille du pas de translation entre chaque acquisition. Ce traitement ainsi proposé est schématisé au milieu de la figure 2.10.

Si la bande de détection sélectionnée se situe directement sur la ligne d'excitation, on peut comparer cette méthode à une détection confocale réalisée avec une fente virtuelle implémentée en post-traitement. Toutefois, il est aussi possible de sélectionner une bande plus éloignée de l'excitation. Selon la bande de détection choisie, il nous sera possible de sélectionner des photons ayant été diffusés un nombre de fois plus ou moins important et ayant donc sondé des profondeurs différentes. Cela nous permettra de faire ressortir la fluorescence d'intérêt d'objets situés plus en profondeur.

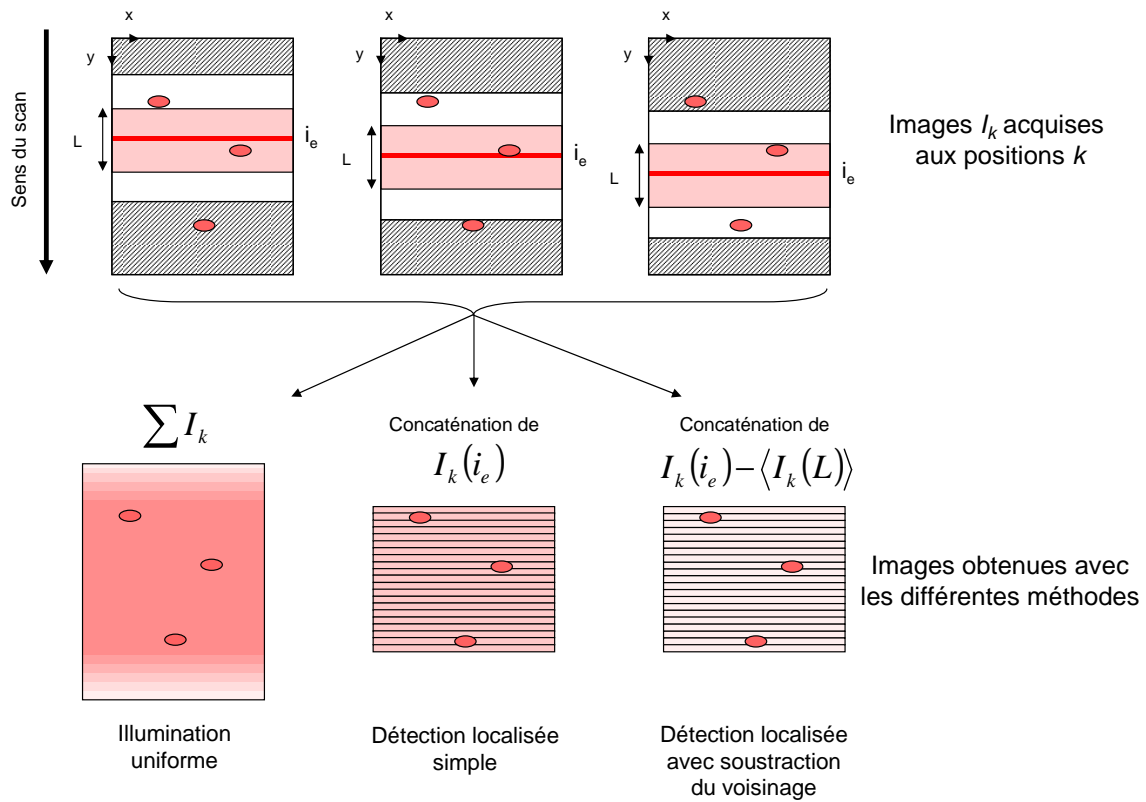


FIGURE 2.10 – Schéma de principe pour la reconstitution de l'image en illumination uniforme (à gauche), en détection localisée simple (au milieu) et en détection localisée avec soustraction du voisinage (à droite).

Nous avons étudié l'intérêt d'utiliser des bandes de détection éloignées de la ligne d'excitation avec le programme NIRFAST^[88, 89] basé sur l'approximation de la diffusion.

NIRFAST (pour *Near InfraRed Fluorescence And Spectral Tomography*) est un logiciel libre et open source (<http://www.dartmouth.edu/nir/nirfast/>) utilisable sous Matlab qui permet de modéliser le parcours de la lumière proche infrarouge dans les tissus à partir de la méthode des éléments finis.

Il permet de modéliser :

- l'absorption et la diffusion à une longueur d'onde unique,
- des études spectrales à plusieurs longueurs d'onde,
- la fluorescence.

Les simulations peuvent être faites aussi bien en deux qu'en trois dimensions, et il est possible de faire de la reconstruction d'image à partir de données réelles.

L'objet utilisé dans les simulations présentées dans ce manuscrit ainsi que son maillage

associé sont décrits en figure 2.11.

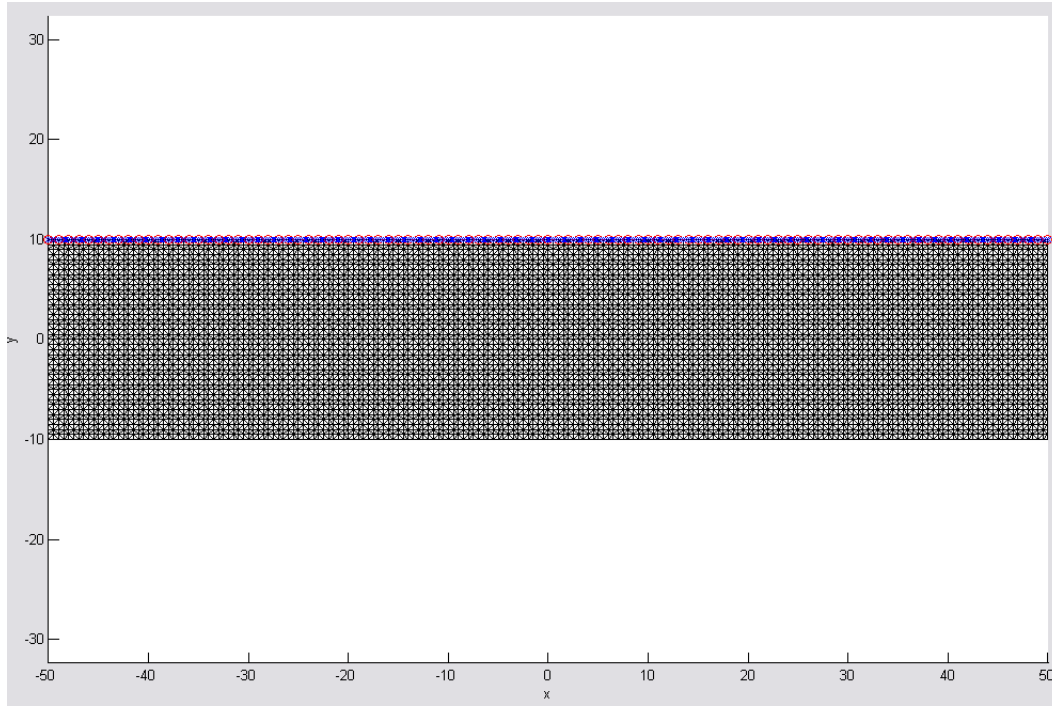


FIGURE 2.11 – Maillage utilisé pour les simulations faites sous Nirfast : fantôme de 100 mm x 20 mm avec 100 sources (\circ) et 500 détecteurs ($*$), noeuds de mailles espacés de 0,5 mm.

Le milieu simulé est un milieu homogène avec des propriétés optiques proches des tissus ($\mu_a = 0 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,9$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$) en géométrie “slab”. Les simulations ont été réalisées en deux dimensions, les ressources nécessaires (en termes de temps et de puissance de calcul) pour simuler les milieux en trois dimensions étant trop importantes.

Une inclusion fluorescente est positionnée au centre du fantôme à 8 profondeurs différentes s'échelonnant entre 1 et 8 mm. Le rendement de fluorescence de cette inclusion est 10 fois plus important que celui de la fluorescence parasite présente dans l'ensemble du fantôme.

Nous avons étudié l'influence de l'écart sources-détecteurs sur le contraste observé aux différentes profondeurs. La définition du contraste utilisée est la suivante :

$$C = \frac{\langle I_T \rangle - \langle I_N \rangle}{\langle I_T \rangle + \langle I_N \rangle} \quad (2.7)$$

où $\langle I_T \rangle$ et $\langle I_N \rangle$ sont respectivement les intensités moyennes dans une zone cible T où se trouve la fluorescence d'intérêt et dans une zone neutre N où l'on a uniquement des signaux parasites tels que l'autofluorescence.

Sur la figure 2.12 à gauche, on peut voir les courbes de contraste obtenues aux différentes profondeurs considérées, pour 30 écarts sources-détecteurs compris entre 1 et 30 mm. On

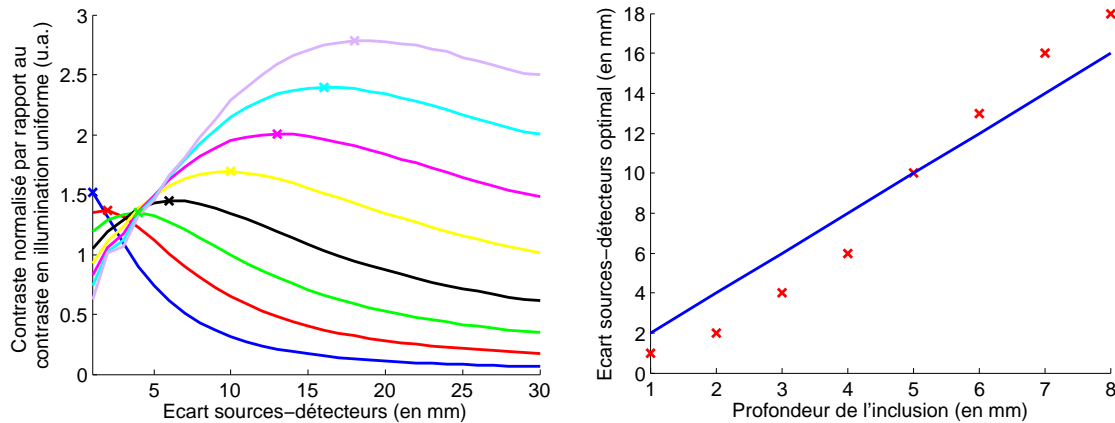


FIGURE 2.12 – A gauche : Influence de l'écart sources-détecteurs sur le contraste observé pour une inclusion à 8 profondeurs comprises entre 1 et 8 mm : inclusion à 1 mm (—), 2mm(—), 3mm(—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm(—), 7mm (—), 8mm(—); A droite : Ecart sources-détecteurs optimal (×) et profondeur empirique (—).

remarque clairement l'influence de la profondeur de l'inclusion observée sur l'écart sources-détecteurs optimal : plus l'inclusion est profonde, plus l'écart sources-détecteurs doit être grand.

En effet, on voit que lorsque l'inclusion est à 1 mm sous la surface, le contraste est maximal pour un écart sources-détecteurs de 1 mm, augmenter l'écart ne fait que diminuer le contraste. Pour l'inclusion la plus profonde à 8 mm, il faut utiliser un écart sources-détecteurs de 20 mm pour obtenir le meilleur contraste possible.

Il existe une règle empirique qui nous permet d'avoir un *a priori* sur la profondeur moyenne sondée par les photons en géométrie de rétrodiffusion lorsqu'on utilise une source et un détecteur séparés. En effet, on estime que la profondeur moyenne de pénétration est de l'ordre de $d/2$, avec d la distance entre la source et le détecteur^[90].

Sur la figure 2.12 à droite, on a tracé cette règle empirique ainsi que l'écart sources-détecteurs optimal trouvé en simulation. On remarque ainsi que les écarts sources-détecteurs optimaux sont proches de cette distance empirique pour laquelle on sonderait principalement la profondeur correspondant à l'inclusion fluorescente.

Nous avons aussi vérifié si le niveau d'autofluorescence pouvait avoir une influence sur l'écart sources-détecteurs optimal. Sur la figure 2.13, on a représenté les courbes de contraste obtenues pour une inclusion à deux profondeurs différentes (2 et 5 mm) et à cinq niveaux d'autofluorescence croissants.

On voit dans ce cas que, pour tous les niveaux d'autofluorescence considérés, l'écart sources-détecteurs optimal reste le même : il est de 2 mm pour l'inclusion à 2 mm de profondeur et de 10 mm pour l'inclusion à 5 mm de profondeur.

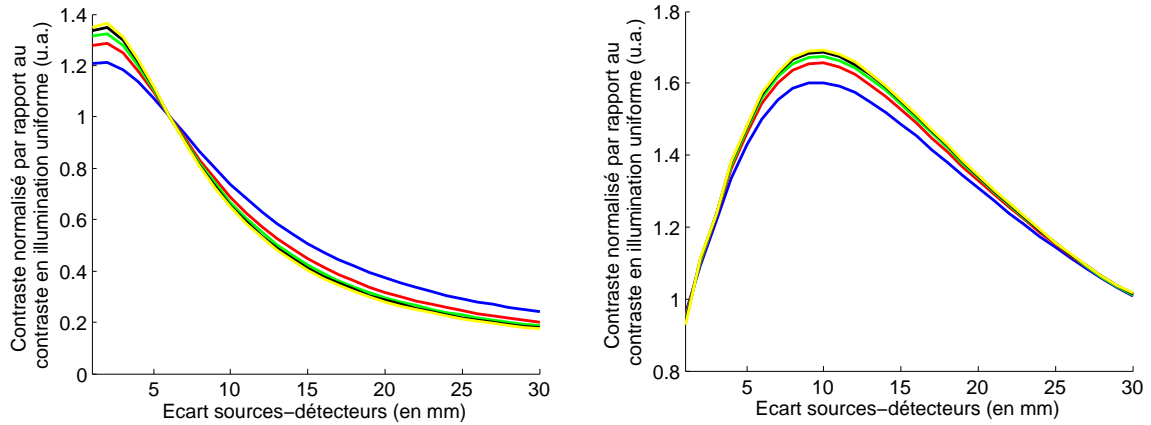


FIGURE 2.13 – Influence de l'écart sources-détecteurs sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm (à gauche) et à 5 mm (à droite) pour 5 niveaux d'autofluorescence : niveau A (—), niveau $2 \times A$ (—), niveau $3 \times A$ (—), niveau $4 \times A$ (—), niveau $5 \times A$ (—).

Enfin, nous avons étudié un cas plus complexe décrit en figure 2.14.

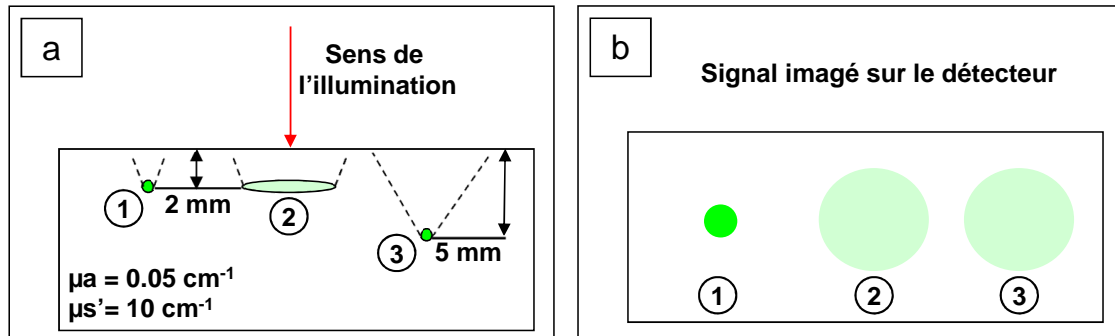


FIGURE 2.14 – a : Représentation schématique du cas complexe considéré avec trois inclusions : les inclusions 1 et 3 ont les mêmes propriétés mais sont localisées à deux profondeurs différentes (respectivement 2 et 5 mm), l'inclusion 2 est localisée à 2 mm de profondeur mais est plus large et a une concentration en fluorophore moins importante ; b : Représentation schématique du signal de fluorescence imagé sur le détecteur en illumination uniforme : les inclusions 2 et 3 ont le même signal et on ne peut les distinguer.

Dans ce cas, nous étudions trois inclusions. Les inclusions 1 et 3 ont les mêmes propriétés (forme et concentration en fluorophore) mais sont localisées à deux profondeurs différentes, respectivement 2 et 5 mm. Nous avons défini la forme et la concentration en fluorophore de l'inclusion 2 qui se situe à 2 mm de profondeur de manière à ce que l'image de son signal de fluorescence sur le détecteur soit équivalente pour une illumination uniforme à l'image du signal de l'inclusion 3 à cause de la diffusion. Ceci nous permet de vérifier si l'écart sources-détecteurs optimal dépend toujours de la profondeur dans ce cas où l'illumination uniforme ne permettrait pas de discriminer les deux inclusions.

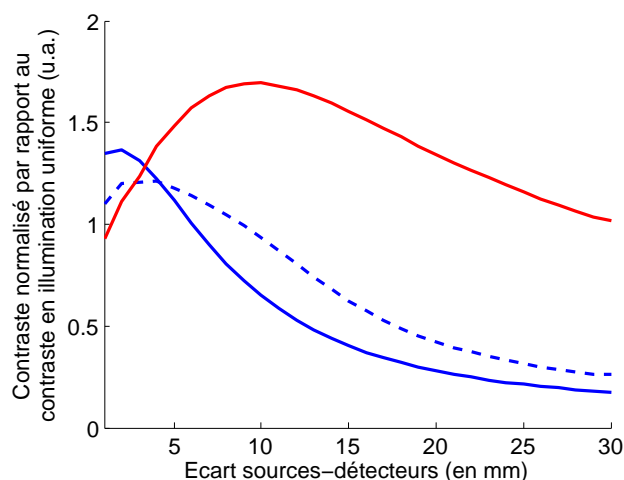


FIGURE 2.15 – Influence de l'écart sources-détecteurs sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm (—), une inclusion à 5 mm (—) et une inclusion à 2 mm ayant un signal comparable à l'inclusion à 5 mm (- - -).

On a tracé en figure 2.15 les courbes de contraste obtenues pour 30 écarts sources-détecteurs compris entre 1 et 30 mm pour les trois inclusions.

On peut voir que, contrairement à l'illumination uniforme où il serait impossible de distinguer les inclusions 2 et 3, la détection localisée simple permet d'avoir une information plus fine en modifiant l'écart sources-détecteurs : en effet, on remarque que l'inclusion 2 a une courbe de contraste plus proche de celle de l'inclusion 1 que de celle de l'inclusion 3. Au niveau des écarts sources-détecteurs optimaux, celui de l'inclusion 2 est de 3 mm, alors que celui de l'inclusion 3 est de 10 mm et celui de l'inclusion 1 est de 2 mm.

Il semblerait donc que la méthode de détection localisée simple permettent de faire la distinction au niveau de la profondeur entre deux inclusions ayant des signaux similaires en observant la variation du contraste en fonction de la distance entre la détection et l'excitation.

2.3.3 Détection localisée avec soustraction du voisinage

En plus de la détection localisée simple décrite dans le paragraphe précédent, nous proposons une "dérivée" de cette méthode qui consiste à sélectionner des bandes de voisinage plus ou moins étendues dont on va soustraire la valeur moyenne à la bande de détection choisie. Ce traitement, décrit dans la figure 2.10 à droite, permet d'améliorer encore plus le contraste, la taille optimale du voisinage à soustraire dépendant de la profondeur de l'objet d'intérêt observé.

Cette amélioration peut s'expliquer de la manière suivante : lors du balayage de l'objet, lorsque la ligne va se retrouver au-dessus d'une cible fluorescente proche de la surface, on va observer une augmentation forte du signal détecté. Ce signal détecté sera composé de la fluorescence d'intérêt et du signal parasite de fond que l'on souhaite retirer. Le signal des bandes

adjacentes à la bande centrale sera par contre beaucoup plus faible et sera principalement composé du signal parasite de fond. Ainsi, les bandes adjacentes peuvent nous donner un *a priori* sur la quantité de signal à retrancher pour faire ressortir la fluorescence d'intérêt. Plus la cible fluorescente sera en profondeur, plus il sera nécessaire de considérer un voisinage large, la fluorescence d'intérêt s'étalant sur une distance plus importante du fait de la diffusion.

Comme pour la méthode de détection localisée simple, nous avons vérifié en simulation l'influence de la profondeur de l'inclusion observée ainsi que du niveau d'autofluorescence sur la taille du voisinage soustrait optimale pour obtenir le meilleur contraste.

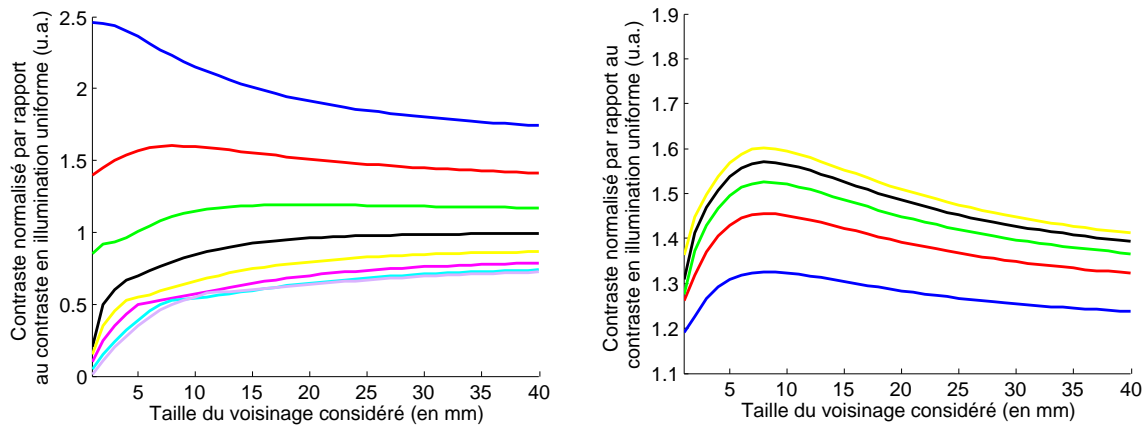


FIGURE 2.16 – **A gauche :** Influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à 8 profondeurs comprises entre 1 et 8 mm : inclusion à 1 mm (—), 2mm(—), 3mm(—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm(—), 7mm (—), 8mm(—); **A droite :** Influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm pour 5 niveaux d'autofluorescence : niveau A (—), niveau $2 \times A$ (—), niveau $3 \times A$ (—), niveau $4 \times A$ (—), niveau $5 \times A$ (—).

On voit sur la figure 2.16 à gauche l'influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à huit profondeurs comprises entre 1 et 8 mm. Comme dans le cas de la détection localisée simple, on remarque un lien entre la profondeur de l'inclusion observée et la taille de voisinage optimale pour obtenir le meilleur contraste : plus l'inclusion est localisée profondément, plus le voisinage considéré doit être grand.

Si l'on compare cette technique à la méthode de détection localisée simple, on peut faire deux observations.

Ainsi, on voit que la détection localisée avec soustraction du voisinage est surtout utile pour les premières profondeurs considérées. En effet, pour les profondeurs supérieures à 4 mm, il n'est plus possible de trouver un voisinage permettant d'améliorer le contraste par rapport à l'illumination uniforme. La détection localisée simple, quant à elle, permettait d'améliorer le contraste pour toutes les profondeurs en choisissant l'écart sources-détecteurs adéquat.

Toutefois, on peut noter que le gain au niveau du contraste est plus important avec la détection localisée avec soustraction du voisinage lorsqu'on considère les inclusions les plus

proches de la surface (1 et 2 mm).

Sur la partie droite de la figure 2.16, on a représenté l'influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm et cinq niveaux d'autofluorescence croissants. On remarque comme dans le cas de la détection localisée simple que le niveau d'autofluorescence n'a pas d'influence sur la taille de voisinage optimale. Dans ce cas, le voisinage optimal doit avoir une largeur de 8 mm pour obtenir le meilleur contraste.

Enfin, comme pour la détection localisée simple, nous avons étudié le cas plus complexe décrit en figure 2.14. Ceci nous permet de vérifier si la taille du voisinage optimale dépend toujours de la profondeur dans ce cas où l'illumination uniforme ne permettrait pas de discriminer les deux inclusions.

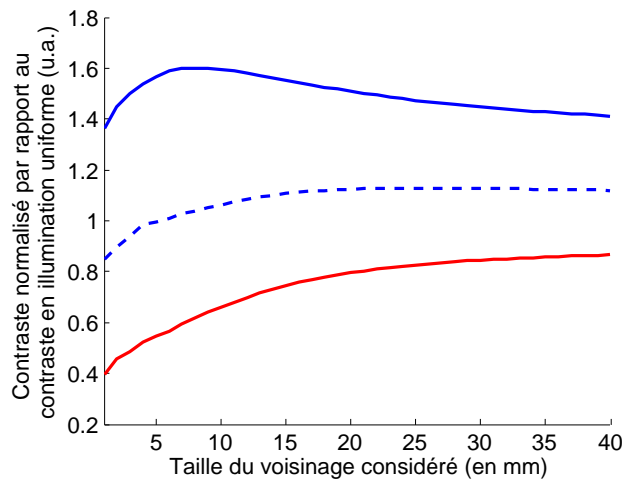


FIGURE 2.17 – Influence de la taille du voisinage considéré sur le contraste observé pour une inclusion à 2 mm (—), une inclusion à 5 mm (—) et une inclusion à 2 mm avec un signal comparable à l'inclusion à 5 mm (- -).

On a tracé, en figure 2.17, les courbes de contraste obtenues pour 40 tailles de voisinage comprises entre 1 et 40 mm pour les trois inclusions décrites en figure 2.14.

Contrairement à la méthode de détection localisée simple où les deux inclusions 1 et 2 avaient des courbes de contrastes relativement proches malgré leurs différences de taille et de concentration, on voit dans ce cas que les deux courbes de contrastes se différencient plus. En effet, pour l'inclusion 1, la taille de voisinage optimale est de 7 mm, tandis que pour l'inclusion 2 elle est de 23 mm. On peut cependant remarquer que l'inclusion 3, malgré son signal équivalent, a elle aussi une courbe de contrastes différente, la taille de voisinage optimale étant supérieure à 40 mm.

La méthode de détection localisée simple semble donc la mieux placée pour faire la distinction au niveau de la profondeur entre deux inclusions ayant des signaux similaires. Ceci peut s'expliquer par le fait que, lorsqu'on sélectionne des bandes de détection éloignées de l'excitation en détection localisée simple, on effectue une sélection des photons ayant pénétré en moyenne à une profondeur spécifique. La détection localisée avec soustraction du voisinage

va quant à elle être sensible principalement à la forme du signal de fluorescence observé, sans pour autant pouvoir faire la distinction entre la forme réelle de l'inclusion ou la forme perçue à cause de la diffusion.

2.4 Méthode d'illumination structurée

2.4.1 Principe de la méthode

Après avoir présenté la technique de détection localisée, nous proposons une technique d'illumination structurée originellement utilisée en microscopie afin d'obtenir une résolution quasi-confocale tout en conservant un large champ d'observation^[91, 92, 93, 94]. Cette technique consiste à illuminer l'échantillon avec une illumination sinusoïdale (que l'on appellera aussi "grille" par la suite) à une fréquence spatiale donnée. Seule la partie de l'objet où la grille est focalisée sera imagée par le système, donnant accès à une coupe de l'objet avec le motif de la grille en superposition dont on voudrait se débarrasser. Pour retirer ce motif, la méthode la plus courante consiste à acquérir trois images I_1 , I_2 et I_3 ayant des facteurs de phase décalés de 120° (figure 2.18).

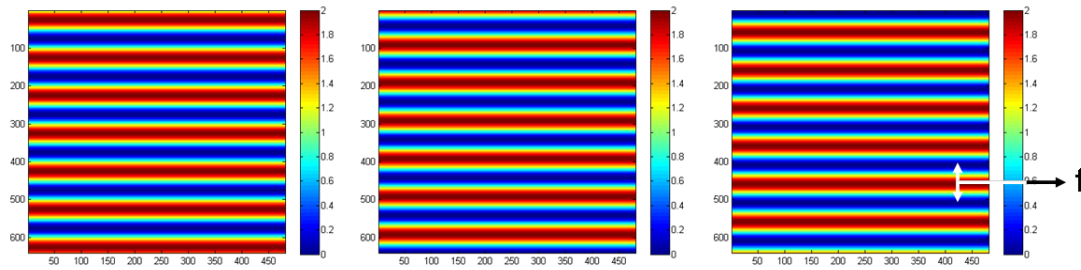


FIGURE 2.18 – Exemple d'illumination modulée à 3 phases décalées de 120° utilisée pour la technique d'illumination structurée, la fréquence spatiale f est illustrée.

On obtient ensuite la composante AC de l'illumination en utilisant la formule suivante :

$$AC = \frac{\sqrt{2}}{3} \left((I_1 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_3)^2 \right)^{1/2} \quad (2.8)$$

En répétant cette opération pour plusieurs fréquences spatiales de la grille d'illumination, on obtient au final une représentation en trois dimensions de l'objet d'étude.

Cette technique a aussi été appliquée au domaine de l'optique diffuse par plusieurs groupes sous le nom de Spatial Frequency Domain Imaging (SFDI). La technique repose dans ce cas sur le fait que la profondeur de pénétration de l'onde d'excitation va dépendre de la fréquence spatiale de la grille : plus la fréquence d'illumination sera grande, plus la profondeur de pénétration sera faible. Le protocole expérimental reste quant à lui le même qu'en microscopie : on fait l'acquisition de trois images à différentes phases puis on obtient la composante démodulée de la lumière avec la formule précédente.

Il est ainsi possible d'appliquer cette méthode pour déterminer les propriétés d'absorption et de diffusion des tissus en modélisant les signaux démodulés avec un modèle de propagation de la lumière pour chaque pixel du détecteur [95]. Dans le cas de l'imagerie de fluorescence, elle permet d'améliorer le signal venant d'objets fluorescents proches de la surface en supprimant les signaux des couches plus profondes [96]. Cette technique permet aussi de réaliser des reconstructions tomographiques en utilisant des formules d'inversion analytiques. Ceci a été appliqué pour reconstruire des contrastes d'absorption [97].

Dans notre cas, l'illumination est structurée en post-traitement. Les images sont acquises en balayant l'objet avec la ligne laser, mais plutôt que de simplement faire la somme décalée des images comme lorsqu'on veut obtenir une simulation d'illumination uniforme, on fait la somme décalée des images que l'on module avec un facteur sinusoïdal introduisant la fréquence spatiale désirée. On fait trois sommes avec, pour chacune d'entre elle, un facteur de phase décalé de 120° afin d'obtenir les trois images nécessaires à la démodulation de la composante AC. Le principe de la méthode est résumé sur la figure 2.19.

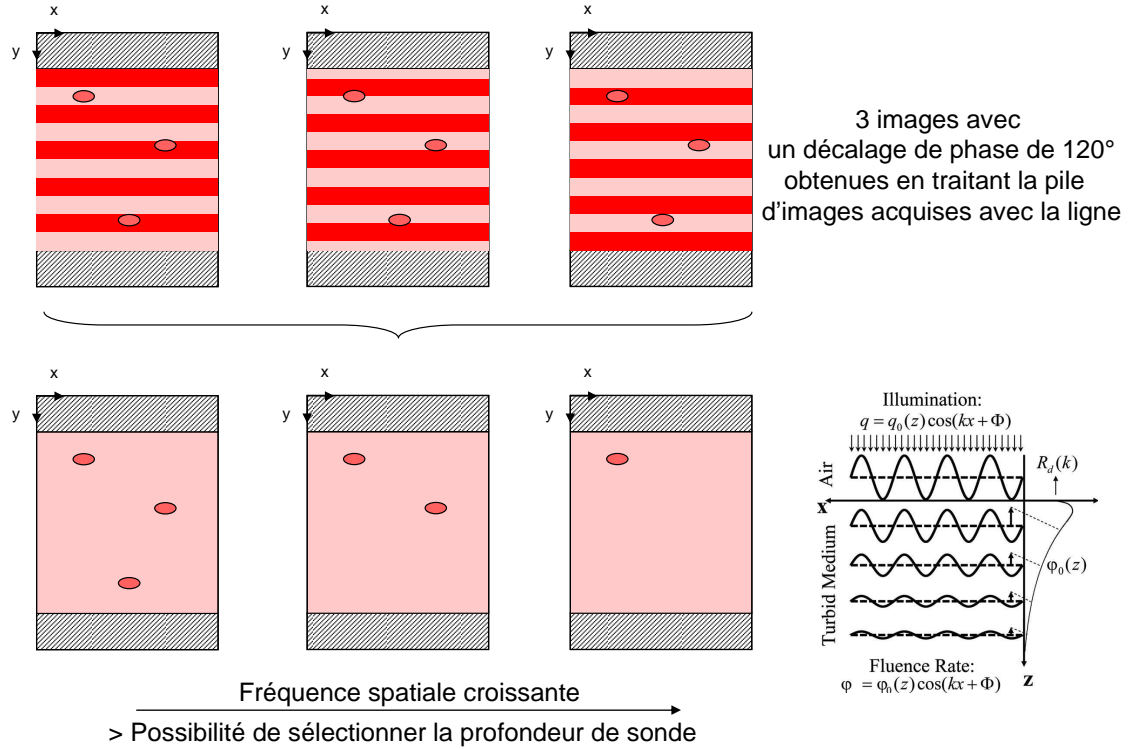


FIGURE 2.19 – Schéma de principe de l'illumination structurée à partir des acquisitions avec une ligne.

2.4.2 Effets de bord observés

Cette façon de simuler l'illumination structurée à partir des images obtenues en scannant l'objet présente toutefois l'inconvénient d'introduire des effets de bords sur l'image AC.

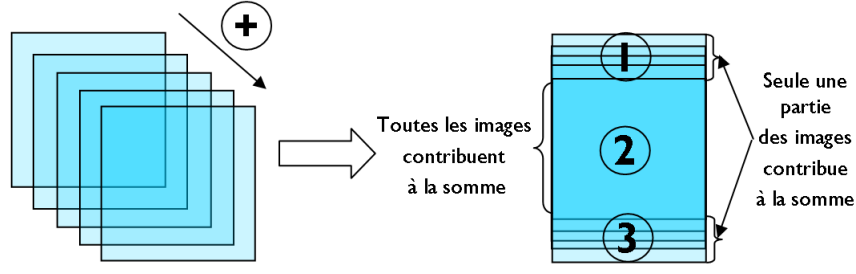


FIGURE 2.20 – Origine des effets de bord due à la reconstruction.

Ces effets de bord sont dus au fait que l'on somme les images pour obtenir les trois images aux phases décalées. Comme on peut le voir sur la figure 2.20, on peut distinguer trois zones dans l'image : une zone 1 où on va avoir un nombre croissant d'images qui vont contribuer à l'image finale, une zone 2 où le nombre de contributions va rester constant, et la dernière zone 3 où le nombre d'images contribuant à la somme va décroître. Pour comprendre pourquoi ces différences entraînent des effets de bord, on peut s'intéresser aux équations qui nous permettent de former les trois images.

En partant de l'hypothèse qu'on a un signal constant I , la N -ième ligne des trois images sera formée de la manière suivante à partir des k images précédentes :

$$I_1(N) = I \sum_{k=1}^N \cos(2\pi f k) = I \frac{\sin(\pi f N)}{\sin(\pi f)} (\cos(\pi f(N+1))) \quad (2.9)$$

$$I_2(N) = I \sum_{k=1}^N \cos(2\pi f k + \frac{2\pi}{3}) = I \frac{\sin(\pi f N)}{\sin(\pi f)} (\cos(\pi f(N+1) + \frac{2\pi}{3})) \quad (2.10)$$

$$I_3(N) = I \sum_{k=1}^N \cos(2\pi f k + \frac{4\pi}{3}) = I \frac{\sin(\pi f N)}{\sin(\pi f)} (\cos(\pi f(N+1) + \frac{4\pi}{3})) \quad (2.11)$$

$$AC(N) = I \frac{\sqrt{6}}{3} \left| \frac{\sin(\pi f N)}{\sin(\pi f)} \right| \sqrt{\sin^2 \left(\pi f(N+1) + \frac{\pi}{3} \right) + \sin^2 \left(\pi f(N+1) + \frac{2\pi}{3} \right) + \sin^2 (\pi f(N+1) + \pi)} \quad (2.12)$$

Dans l'équation 2.12, le terme qui va être à l'origine des artéfacts est le terme $\left| \frac{\sin(\pi f N)}{\sin(\pi f)} \right|$. En effet, le facteur N , qui correspond au nombre d'images utilisées pour obtenir l'image finale, est variable dans les zones 1 et 3, introduisant une variation sinusoïdale tandis qu'il reste constant dans la zone 2. C'est ce qu'on peut voir sur la figure 2.21 qui représente des profils d'intensité simulés pour un signal constant avec des intensités de base différentes : plus l'intensité de base est importante (le bruit de lecture de notre caméra en expérimental), plus les effets de bord seront visibles, mais la zone de validité (zone centrale où le nombre d'images contribuant à la somme reste constant) n'est pas impactée.

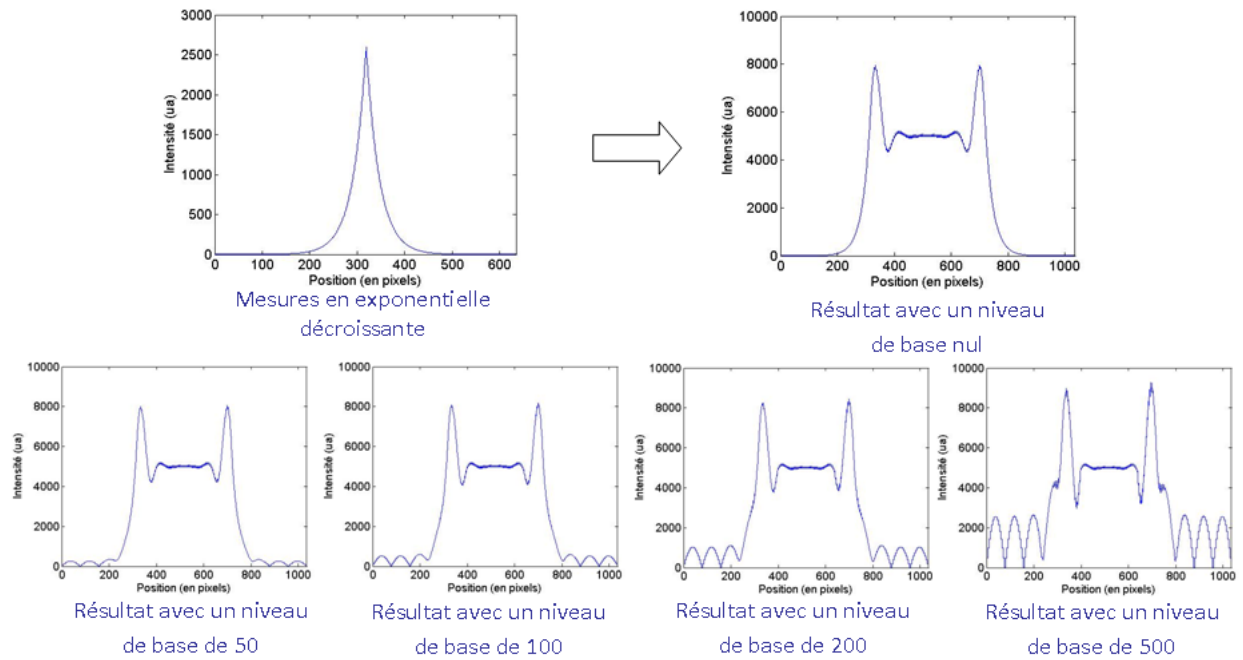


FIGURE 2.21 – Evolution des effets de bords en fonction du niveau de fond.

Un autre effet de bord qui découle de notre façon de procéder est visible sur la figure 2.22. On voit sur les profils des images AC que des pics apparaissent aux bords de la zone de validité dans le cas d'une fréquence élevée. Ce phénomène devient de plus en plus remarquable au fur et à mesure que la fréquence spatiale utilisée augmente. Ceci s'explique par le fait que, pour les fréquences les plus élevées, la modulation sinusoïdale va entraîner une oscillation du signal hors de la zone de validité, causant un décalage entre les trois images.

Ces effets de bord ne posent toutefois pas de problème en pratique : il suffit de balayer le milieu avec la ligne sur une zone suffisamment large pour que la zone de validité recouvre la zone à étudier.

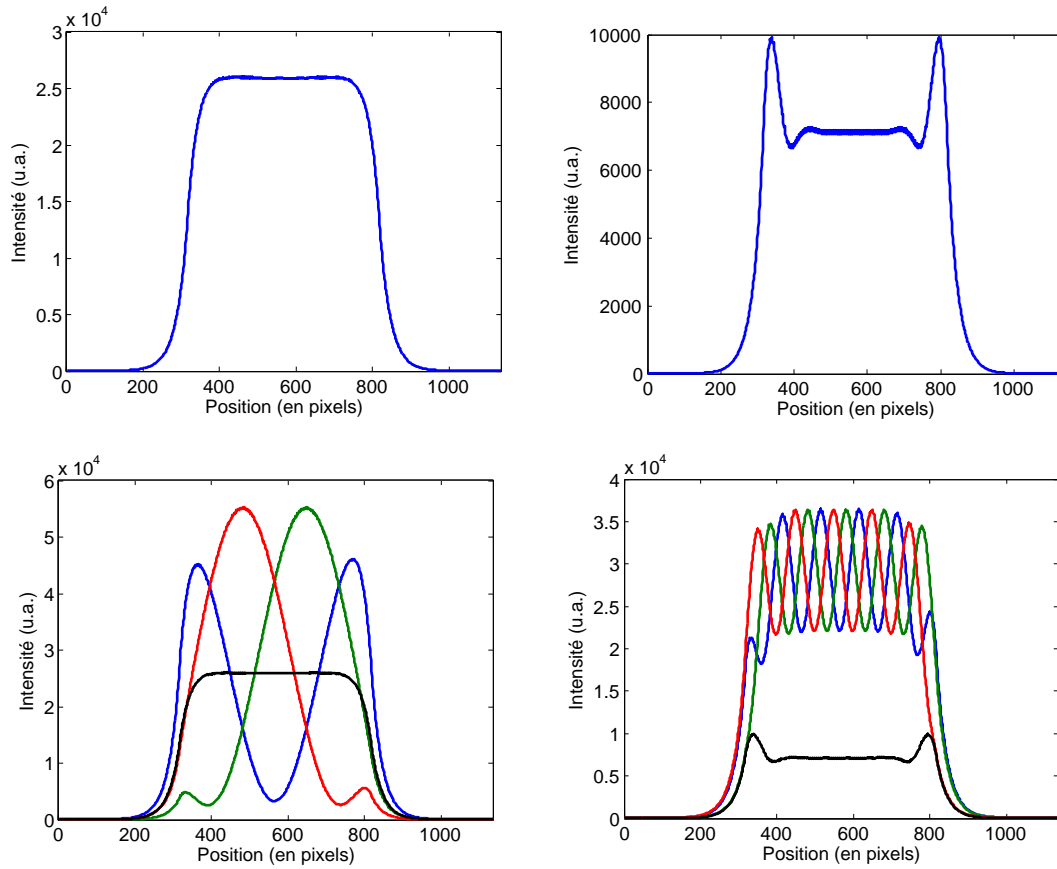


FIGURE 2.22 – Profils d'intensité de l'image AC (en haut) et des images I_1 , I_2 et I_3 (en bas) pour une fréquence faible (à gauche) et une fréquence élevée (à droite).

2.5 Méthode tirant parti du lien entre les signaux d'excitation et d'autofluorescence

2.5.1 Hypothèse

Nous avons émis l'hypothèse que, pour un milieu homogène, il existe un lien entre la forme de l'excitation E et la forme de l'autofluorescence A [34] :

$$E = \frac{\exp(-kr)}{4\pi Dr}, A = \frac{\exp(-kr)}{4\pi D} \quad (2.13)$$

Nous avons tout d'abord pensé à étudier le ratio A/E . En effet, si notre hypothèse se vérifie, on devrait avoir une variation linéaire du ratio A/E en fonction de la distance, et connaître la forme de l'excitation pourrait alors nous renseigner sur la forme de l'autofluorescence.

Nous avons vérifié cette hypothèse à la fois de manière expérimentale et à partir de simulations.

2.5.2 Simulation

Deux types de simulations sont faites pour vérifier la validité de notre hypothèse : d'une part avec la méthode de Monte Carlo, et d'autre part en utilisant le programme NIRFAST.

Dans les deux cas, le milieu simulé est un milieu homogène avec des propriétés optiques proches des tissus ($\mu_a = 0 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,9$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$) en géométrie "slab". On étudie à la fois les profils d'excitation et de fluorescence et on s'intéresse à leur ratio afin de voir si on retrouve la relation linéaire intuitée pour différents niveaux d'autofluorescence. Les simulations ont été réalisées en deux dimensions, les ressources nécessaires pour simuler les milieux en trois dimensions étant trop importantes.

La figure 2.23 présente les résultats obtenus avec la méthode de Monte Carlo.

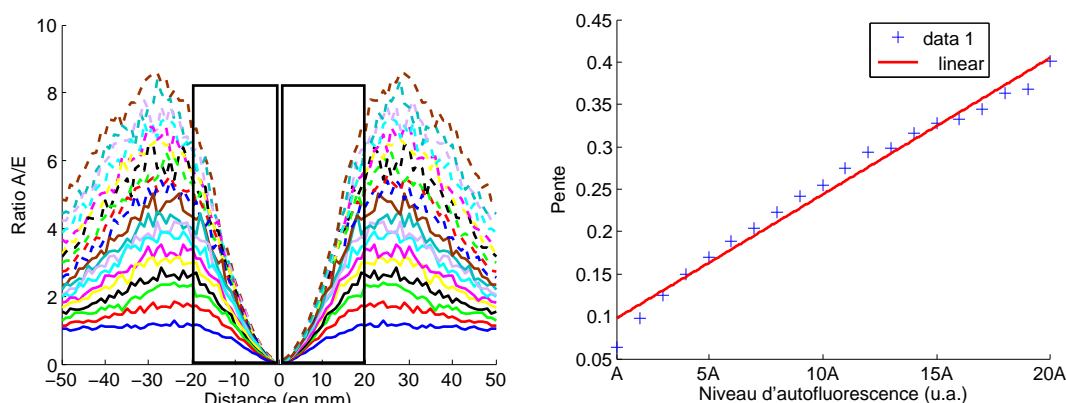


FIGURE 2.23 – Ratios d'intensité A/E obtenus avec le code de Monte Carlo pour des niveaux croissants de fluorescence (à gauche) et valeurs des pentes des ratios avec leur régression linéaire (à droite).

On voit sur la figure 2.23, à gauche, plusieurs ratios de profils A/E pour des niveaux d'autofluorescence croissants. On voit clairement une partie linéaire jusqu'à une distance d'environ 20 mm, la zone de linéarité étant indiquée par des rectangles noirs sur la figure. Cette linéarité prend fin lorsqu'on s'éloigne trop du point d'excitation. Ceci est dû au bruit sur les profils de fluorescence et d'excitation pour les distances trop grandes par rapport à l'origine de l'excitation.

Sur la figure 2.23 à droite, on a tracé les valeurs des pentes des ratios A/E dans la zone linéaire. On note que les pentes évoluent bien de façon linéaire avec le niveau d'autofluorescence.

Cette relation linéaire est encore plus visible sur les simulations faites avec NIRFAST présentées sur la figure 2.24.

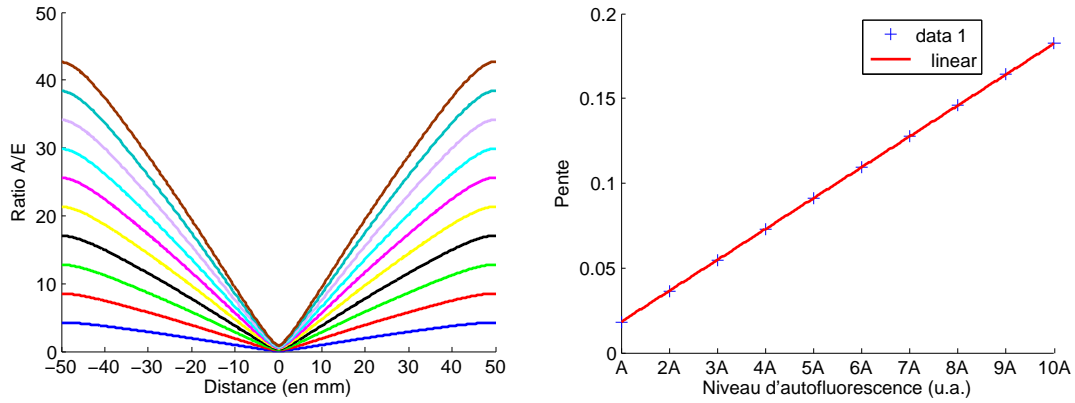


FIGURE 2.24 – Ratios d'intensité A/E obtenus avec NIRFAST pour des niveaux croissants de fluorescence (à gauche) et valeurs des pentes des ratios avec leur régression linéaire (à droite).

Dans ce cas, on voit à gauche de la figure 2.24 que la linéarité est valide quelle que soit la distance. On utilise en effet un modèle de propagation idéal et non plus une technique de lancer de photons comme dans le cas précédent. De même, la relation entre la valeur des pentes des ratios A/E et le niveau d'autofluorescence visible sur la droite de la figure 2.24 est parfaitement linéaire.

Nous allons maintenant expliquer comment nous tirons parti de notre hypothèse concernant le lien entre les signaux d'excitation et d'autofluorescence pour diminuer l'autofluorescence observée.

Si l'on considère que l'intensité totale I_{tot} mesurée sur le détecteur s'écrit :

$$I_{tot} \approx F + A + E$$

$$I_{tot} \approx F + r.E + E$$

où F est le signal de fluorescence d'intérêt, A est l'autofluorescence et E représente les fuites d'excitation, en faisant la modélisation de I_{tot} par $\alpha E + \beta E.r$, il devrait être possible de retrouver F par soustraction.

La méthode de modélisation la suivante : pour chaque position de l'excitation, on récupère à la fois le signal d'excitation et le signal de fluorescence. On modélise ensuite, pour toutes les positions, le profil d'intensité de fluorescence à partir du profil d'intensité d'excitation correspondant, en utilisant la méthode des moindres carrés.

On obtient alors des paramètres α et β propres à chacune des positions. Ces paramètres devraient être quasiment constants pour les positions d'excitation où l'on n'excite que de l'autofluorescence et ne varient fortement que pour les positions où l'on excite aussi la fluorescence d'intérêt. On a alors deux possibilités : soit on utilise les paramètres propres à chacune des positions (que l'on nommera "paramètres locaux" dans la suite de ce manuscrit), soit on utilise

les paramètres moyennés sur toutes les positions d'excitation (que l'on nommera "paramètres globaux" dans la suite de ce manuscrit). Comme nous allons le voir avec les deux simulations suivantes faites avec NIRFAST, chacune de ces possibilités possède des avantages et des inconvénients.

Dans le premier cas étudié, on a utilisé le même milieu que précédemment (figure 2.11) auquel on a ajouté une inclusion fluorescente unique à 2 mm sous la surface. Le fantôme simulé ainsi que les différents profils d'intérêt sont présentés sur la figure 2.25.

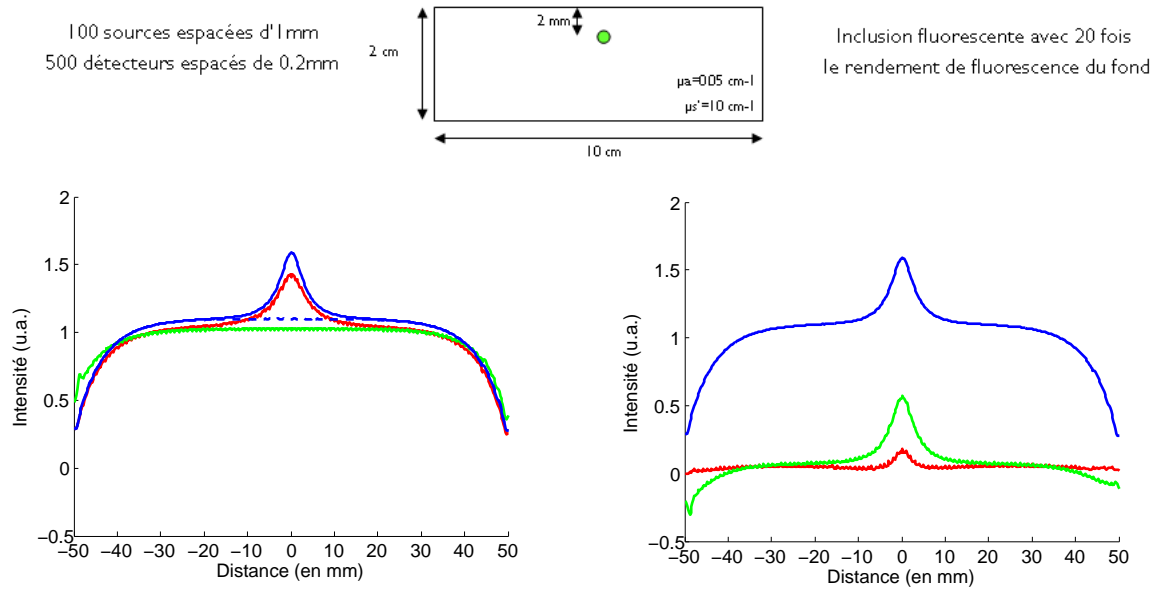


FIGURE 2.25 – Comparaison des profils d'intensité : à gauche : — fluorescence brute F , - - - autofluorescence, — modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, — modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux ; à droite : — : F , — : $(F - M_1)$, — : $(F - M_2)$.

Comme on peut s'y attendre, le profil obtenu en utilisant les paramètres locaux (profil noté M_1 , en rouge sur la figure 2.25 à gauche) suit le profil de fluorescence brut en détectant l'inclusion alors que le profil obtenu avec les paramètres globaux (profil noté M_2 , en vert sur la figure 2.25 à gauche) n'est pas sensible à l'inclusion et est plus proche de celui de l'auto fluorescence. Après soustraction des profils, les deux méthodes permettent de faire ressortir la fluorescence d'intérêt en ayant supprimé l'auto fluorescence. Avec les paramètres globaux, on a une meilleure dynamique autour de l'inclusion tout en ayant des effets de bord.

Le deuxième cas étudié est un cas complexe avec plusieurs inclusions fluorescentes positionnées à la même profondeur et avec la même concentration de fluorophore. Cette configuration a été étudiée pour vérifier si l'utilisation des paramètres globaux reste la plus intéressante comme dans le cas d'une inclusion simple. Le fantôme simulé ainsi que les différents profils d'intérêt sont présentés sur la figure 2.26.

Dans le cas précédent, les paramètres α et β calculés variaient uniquement pour les po-

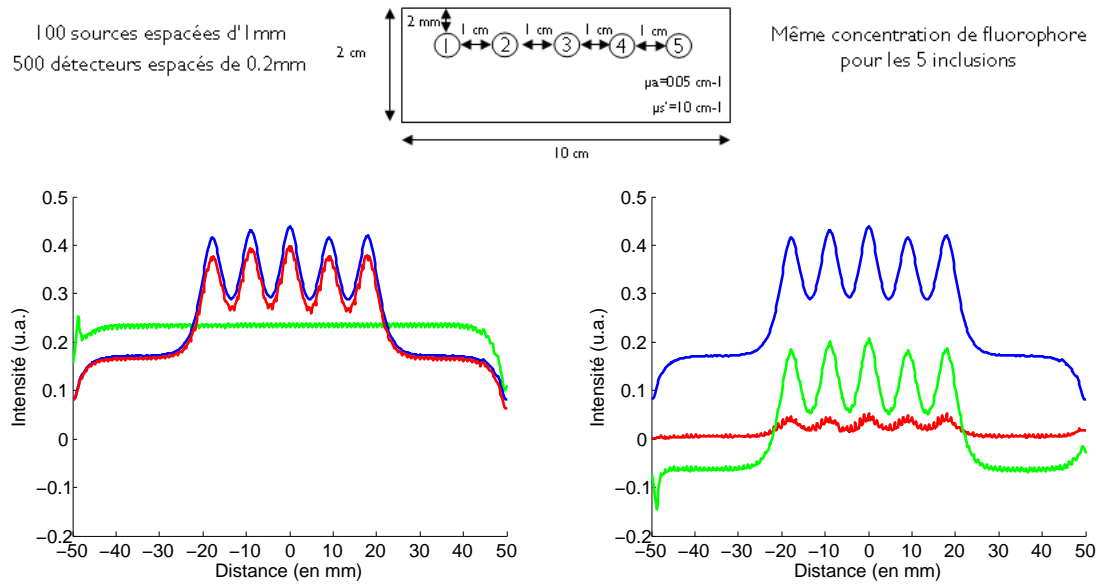


FIGURE 2.26 – Comparaison des profils d'intensité : à gauche : — fluorescence brute F , — modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, — modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux ; à droite : — : F , — : $(F - M_1)$, — : $(F - M_2)$.

sitions d'excitation situées autour de l'inclusion fluorescente. Utiliser leur valeur moyenne permettrait donc de s'approcher de la valeur des paramètres pour les positions d'excitation où seule l'autofluorescence était présente.

Dans ce cas, les paramètres α et β calculés ne varient aussi que pour les positions d'excitation situées autour des inclusion fluorescentes. Cependant, on a cette fois-ci cinq inclusions alors que le champ excité conserve la même taille. Comme le nombre de positions d'excitation ayant des paramètres dépendant des inclusions fluorescentes est plus important, le fait d'utiliser leur valeur moyenne va entraîner une surestimation de l'autofluorescence. Après soustraction (profil noté $(F - M_2)$, en vert sur la figure 2.26 à droite), on a donc un niveau de fond négatif avec les paramètres globaux.

Avec les paramètres locaux (profil noté $(F - M_1)$, en rouge sur la figure 2.26 à droite), l'autofluorescence est annulée correctement sans être surestimée, mais on a une dynamique inférieure au niveau des inclusions fluorescentes comme dans le cas précédent.

En plus de ces différences au niveau de la réduction de l'autofluorescence et de la dynamique, on peut aussi observer des différences entre les modélisations avec paramètres locaux ou globaux au niveau de la résolution des inclusions fluorescentes après traitement.

Ceci est démontré dans le troisième cas étudié. Dans ce cas, nous observons deux inclusions fluorescentes positionnées à la même profondeur et avec la même concentration de fluorophore. La profondeur des inclusions est la même que dans le cas précédent, mais l'écart latéral entre les inclusions a été réduit (1 cm dans le cas précédent, 4 mm dans ce cas) afin de rendre plus

visible les différences entre les deux choix au niveau des paramètres. Le fantôme simulé ainsi que les différents profils d'intérêt sont présentés sur la figure 2.27. Pour cette étude, nous avons réduit l'écart entre les sources afin d'augmenter la précision, mais cela a impliqué un nombre de sources et de détecteurs réduits.

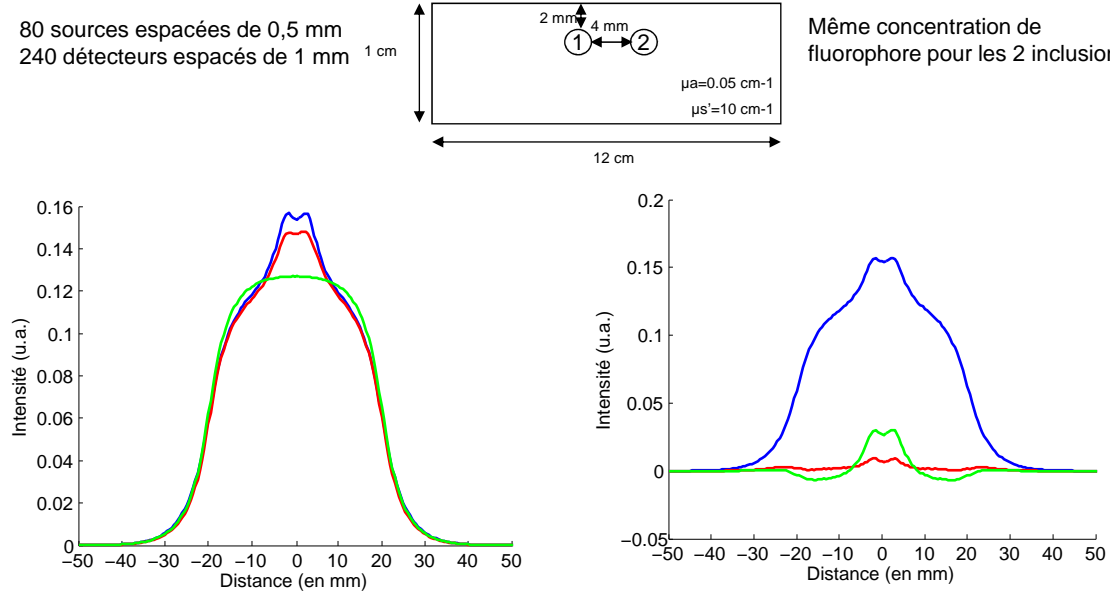


FIGURE 2.27 – Comparaison des profils d'intensité : à gauche : — fluorescence brute F , — modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, — modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux ; à droite : — F , — : $(F - M_1)$, — : $(F - M_2)$.

Comme dans les deux cas précédents, on retrouve le fait que le traitement avec la modélisation par l'excitation permet d'annuler la contribution de l'autofluorescence que ce soit avec les paramètres locaux ou globaux. Les paramètres locaux ont l'avantage de ne pas surestimer l'autofluorescence, mais les paramètres globaux offrent une meilleure dynamique au niveau du signal d'intérêt.

Cependant, on peut noter un autre avantage pour la méthode avec les paramètres locaux si l'on normalise les profils de fluorescence autour des deux inclusion. Ces profils d'intensité normalisés sont représentés sur la figure 2.28.

On peut voir sur cette figure que le traitement avec les paramètres globaux (profil noté $(F - M_2)$, en vert sur la figure 2.28) offre une résolution identique à la résolution d'origine obtenue en illumination uniforme (profil noté F , en bleu sur la figure 2.28). Le traitement avec les paramètres locaux (profil noté $(F - M_1)$, en rouge sur la figure 2.28) permet quant à lui d'avoir une meilleure résolution, la séparation entre les deux pics de fluorescence étant meilleure. En effet, le rapport entre le pic d'intensité des inclusions et le creux entre eux est de 8% environ au départ alors qu'il est de 35% après traitement avec les paramètres locaux. Ceci est dû au fait que l'on tire réellement parti de l'information à chacune des positions d'excitation et que l'on retrouve des améliorations de résolution semblable à ce qu'on observe

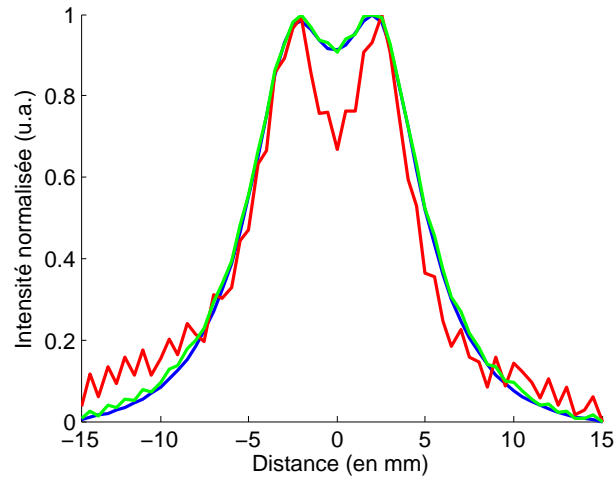


FIGURE 2.28 – Profils d'intensité normalisés de la fluorescence brute (— : F), de la soustraction de la modélisation avec les paramètres locaux M_1 à la fluorescence brute F (— : $(F - M_1)$) et de la soustraction de la modélisation avec les paramètres globaux M_2 à la fluorescence brute F (— : $(F - M_2)$).

en détection localisée simple.

Le choix entre le traitement avec les paramètres locaux ou avec les paramètres globaux doit donc se faire en fonction du cas étudié, les deux possibilités ayant leurs propres avantages et inconvénients. Les paramètres locaux offrent une résolution meilleure et ne surestiment pas le signal parasite au prix d'une baisse de dynamique au niveau de la fluorescence d'intérêt qui peut devenir problématique lorsque le niveau de signal est bas. Les paramètres globaux offrent quand à eux une meilleure dynamique autour de l'inclusion mais peuvent entraîner une surestimation du signal parasite lorsqu'on a beaucoup de variation du signal de fluorescence (ceci peut toutefois être évité en faisant un scan sur une zone suffisamment grande pour considérer principalement des positions où l'on n'excite que l'auto fluorescence).

2.5.3 Vérification expérimentale

Pour vérifier notre hypothèse expérimentalement, des mesures ont été faites sur un fantôme autofluorescent de manière à avoir des images de la fluorescence ainsi que de l'excitation. Les images reconstituées de fluorescence et d'excitation sont représentées sur la figure 2.29.

Nous avons alors étudié la relation existant entre la forme de l'excitation et la forme de l'auto fluorescence afin de vérifier que l'on retrouve bien expérimentalement les constatations faites en simulation.

Sur la figure 2.30, on voit d'une part la comparaison des profils de l'auto fluorescence et de l'excitation, et d'autre part le ratio ainsi que sa modélisation par une fonction affine.

Ces deux figures sont prises pour une position donnée de la ligne, mais, pour chaque endroit

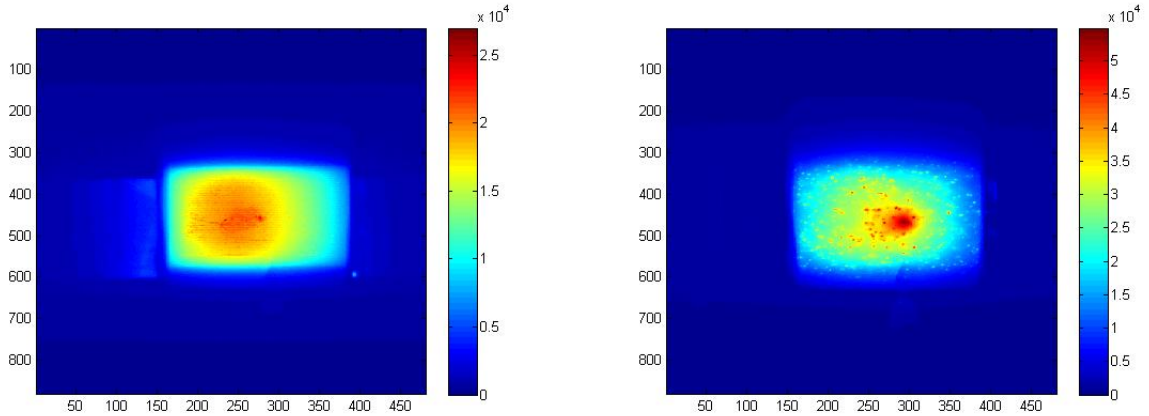


FIGURE 2.29 – Images reconstituées d'excitation (à gauche) et de fluorescence (à droite).

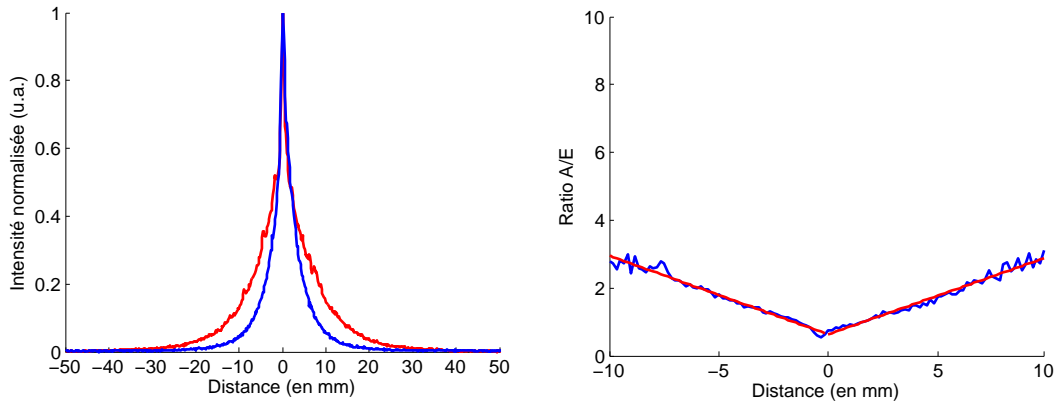


FIGURE 2.30 – Profils normalisés de l'autofluorescence (en rouge) et de l'excitation (en bleu) à gauche, et ratio de l'autofluorescence par l'excitation (en bleu) avec sa modélisation (en rouge) à droite.

observé où il n'y a pas d'inclusion fluorescente, on retrouve le même comportement linéaire du ratio F/E (où F est le signal de fluorescence et E le signal d'excitation).

En revanche, lorsqu'on va s'approcher d'une inclusion fluorescente, la forme du profil de fluorescence va bien sûr être modifiée tandis que la forme de l'excitation restera inchangée, ce qui impactera la pente du ratio F/E .

Tout comme avec le code de Monte Carlo et avec NIRFAST, on a étudié les ratios des profils A/E pour plusieurs niveaux d'autofluorescence croissants. Ces résultats sont présentés sur la figure 2.31.

Sur la gauche de la figure 2.31, on retrouve des ratios et des comportements très proches de ceux obtenus avec le code de Monte Carlo : on voit nettement une partie linéaire jusqu'à environ 17 mm, la zone de linéarité étant indiquée par des rectangles noirs sur la figure. La

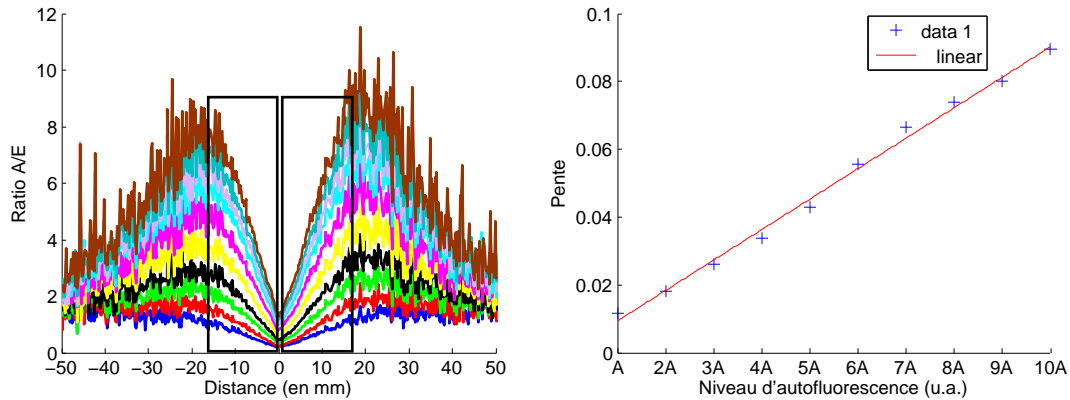


FIGURE 2.31 – Ratios d'intensité A/E obtenus expérimentalement pour des niveaux croissants de fluorescence (à gauche) et valeurs des pentes des ratios avec leur régression linéaire (à droite).

linéarité se dégrade lorsqu'on s'éloigne trop du point d'excitation, ceci étant dû au bruit sur les profils de fluorescence et d'excitation pour les distances trop grandes par rapport à l'origine de l'excitation.

Sur la figure 2.31 à droite, on a tracé les valeurs des pentes des ratios A/E dans la zone linéaire. On note là encore que les pentes évoluent bien de façon linéaire avec le niveau d'autofluorescence.

La méthode de modélisation schématisée en figure 2.32 est la même que celle décrite dans la section précédente : pour chaque position de la ligne, on prend une image d'excitation et une image de fluorescence. On modélise ensuite le profil d'intensité de fluorescence pour chaque colonne de chaque image avec le profil d'intensité de l'image d'excitation correspondante en utilisant la méthode des moindres carrés.

On a représenté sur la figure 2.33 des exemples de modélisation à cinq positions d'excitation différentes prises autour d'une inclusion fluorescente. Sur la première ligne de la figure, on peut voir les images de fluorescence ainsi que les deux colonnes qui vont être utilisées en exemple : la colonne 1 est située au niveau de l'inclusion fluorescente et la colonne 2 est située à un endroit où seul le signal d'autofluorescence est détecté. Sur la deuxième ligne de la figure, on a tracé pour la colonne 1 les profils d'intensité de fluorescence et de sa modélisation pour les cinq positions. Enfin, sur la troisième ligne de la figure, on a tracé pour la colonne 2 les profils d'intensité de fluorescence et de sa modélisation pour les cinq positions.

On voit ainsi sur cette dernière ligne où l'on ne considère que le signal d'autofluorescence que les profils de la fluorescence et de sa modélisation sont quasi identiques pour les cinq positions considérées. En soustrayant sa modélisation au signal de fluorescence, on obtient ainsi un niveau nul et on supprime la contribution de l'autofluorescence.

Cependant, sur la deuxième ligne où l'on considère une colonne dans laquelle on détecte une partie du signal de fluorescence d'intérêt, on voit cette fois des différences entre les profils

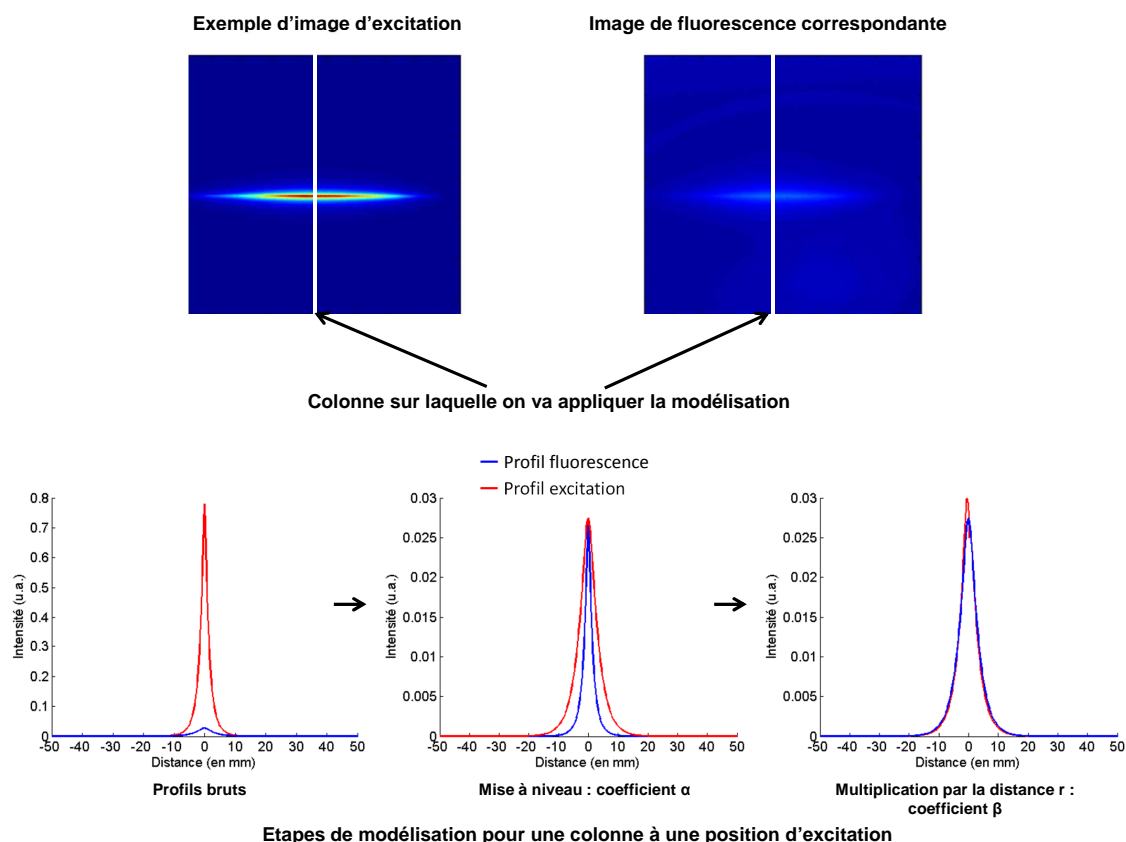


FIGURE 2.32 – Exemple de modélisation de la fluorescence par l'excitation pour une colonne.

de la fluorescence et de sa modélisation. Ces différences sont de plus en plus importantes au fur et à mesure que l'on s'intéresse à des positions d'excitation proches de l'inclusion fluorescente. Dans ce cas, si l'on soustrait sa modélisation au signal de fluorescence, on va alors supprimer la contribution de l'autofluorescence mais pas la contribution de la fluorescence d'intérêt.

Comme on l'avait vu en simulation, il est donc possible de supprimer le signal d'autofluorescence parasite en soustrayant aux images de fluorescence leurs modélisations faites à partir des images d'excitation.

Sur la figure 2.34, on donne un exemple de résultat obtenu avec cette méthode de modélisation par l'excitation.

On peut y voir l'image de fluorescence acquise sur le détecteur (à gauche), sa modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux (au milieu), et l'image résultant de la soustraction de ces deux images (à droite). Le fond est clairement réduit dans l'image finale, augmentant ainsi le contraste de la fluorescence d'intérêt.

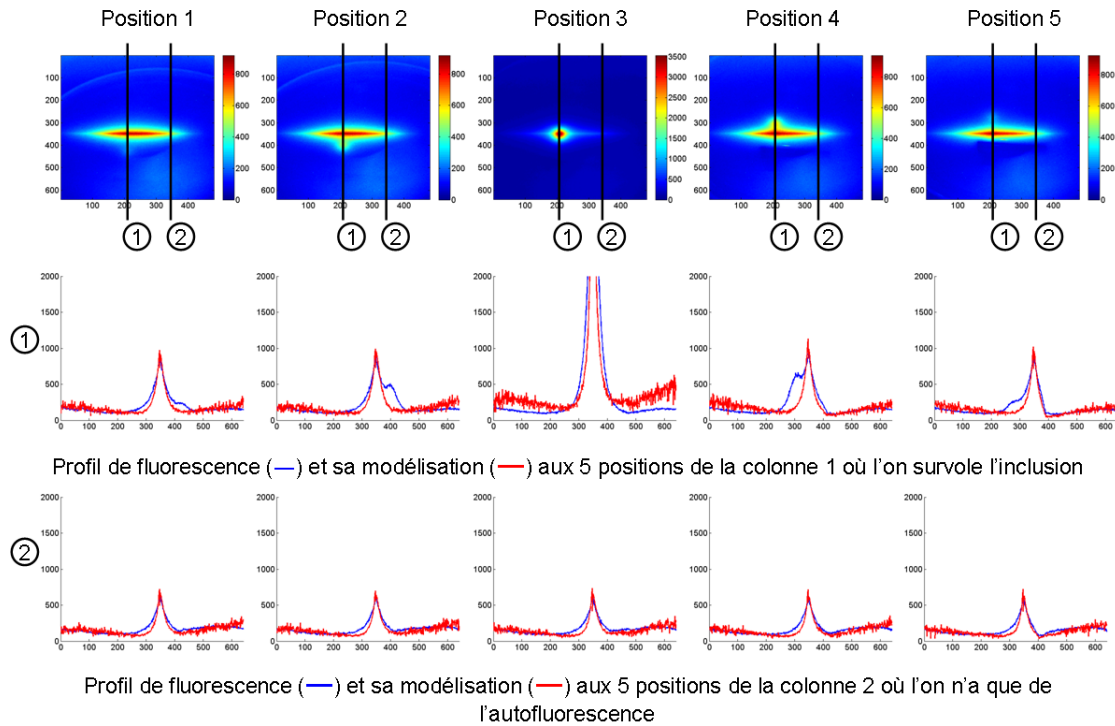


FIGURE 2.33 – Exemple de modélisations pour cinq positions de la ligne autour d'une inclusion fluorescente ; première ligne : images de fluorescence avec les deux colonnes qui vont être utilisées en exemple, la colonne 1 est située au niveau de l'inclusion fluorescente et la colonne 2 est située à un endroit où seul le signal d'auto fluorescence est détecté ; deuxième ligne : profils d'intensité de fluorescence et de sa modélisation pour les cinq positions pour la colonne 1 ; troisième : profils d'intensité de fluorescence et de sa modélisation pour les cinq positions on a tracé pour la colonne 2.

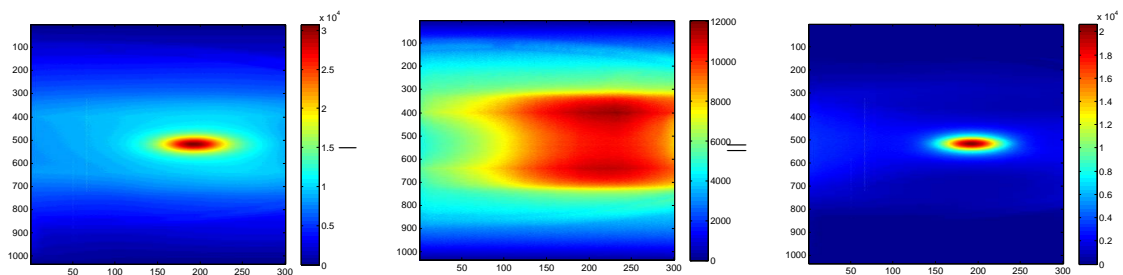


FIGURE 2.34 – Exemple de résultat obtenu avec la modélisation par l'excitation : on obtient l'image finale (à droite) en soustrayant à l'image de fluorescence de base acquise sur le détecteur (à gauche) sa modélisation par l'excitation (au milieu, faite avec les paramètres globaux).

2.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté en détail les différentes méthodes de détection auxquelles on a accès en utilisant l'illumination ligne et comment ces méthodes nous permettent d'améliorer le contraste et la résolution par rapport à une illumination uniforme.

Les trois axes d'exploitation de la pile d'images obtenue avec l'illumination sont les suivants.

Tout d'abord, la méthode de détection localisée consiste à ne sélectionner qu'une bande de pixels unique sur chacune des images de la pile. Cette bande de détection peut se situer directement sur l'excitation ou bien être éloignée de celle-ci. On a vu que la distance entre la bande de détection et la ligne d'excitation permet de sélectionner une profondeur de pénétration moyenne afin d'optimiser encore le contraste obtenu avec cette méthode. On a aussi présenté une variante de cette méthode qui consiste à faire la détection sur une bande et à utiliser le signal voisin de la bande de détection afin d'obtenir un *a priori* sur le signal parasite à retirer. Cette méthode dérivée offre des résultats encore meilleurs pour les objets fluorescents proches de la surface (sur les deux premiers millimètres dans nos simulations).

La seconde méthode présentée est une implémentation de la technique d'illumination structurée. Contrairement à l'implémentation classique qui consiste à illuminer l'échantillon observé avec un motif sinusoïdal, nous en faisons une modulation de la pile d'images afin d'avoir ce motif sinusoïdal sur la détection. Les informations obtenues sont toutefois équivalentes, et nous sommes capables de sélectionner la profondeur de pénétration de la lumière en modifiant la fréquence spatiale de la modulation. On a aussi présenté les effets de bord qui peuvent être générés en modulant les images détectées, ces effets de bords pouvant être évités en pratique en faisant un scan de l'échantillon suffisamment large.

Enfin, la troisième et dernière méthode présentée repose sur l'utilisation des images acquises à la longueur d'onde d'excitation pour avoir un *a priori* sur le signal parasite à retirer des images de fluorescence. Nous sommes partis de l'hypothèse qu'il existe un lien entre la forme de l'excitation et de l'autofluorescence parasite. Nous avons démontré ce lien en simulations et expérimentalement, puis nous avons donné une méthode permettant de tirer parti de ce lien, la modélisation de l'autofluorescence par l'excitation pouvant être réalisée avec les paramètres de toutes les positions d'excitation (paramètres locaux) ou bien leur valeur moyenne (paramètres globaux). Nous avons aussi présenter les avantages et inconvénients de ces deux manières de réaliser la modélisation.

Bien que chacun de ces trois axes permet d'avoir une amélioration du contraste et de la résolution par rapport à l'illumination uniforme classique, on peut déjà noter des distinctions entre eux.

Les méthodes de détection localisée sont en effet les plus simples à implémenter, contrairement à l'illumination structurée et la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation qui demandent plus de temps de calcul.

Les méthodes de détection localisée et l'illumination structurée permettent d'avoir une

information sur la profondeur de la cible fluorescente, mais la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation paraît la mieux placée pour retirer efficacement tout signal de fluorescence parasite.

Dans le prochain chapitre, nous présenterons le montage expérimental utilisé pour obtenir les images nécessaires à la mise en œuvre de ces méthodes, ainsi que les fantômes utilisés afin de simuler les tissus. Nous présenterons aussi le protocole expérimental suivi pour la validation *in vivo* sur petit animal de ces méthodes. Enfin, nous proposerons des idées d'amélioration du montage qui permettraient d'implémenter certaines de ces méthodes en temps réel.

Les résultats obtenus avec les méthodes présentées dans ce chapitre dans différents cas nous permettant de quantifier leurs apports en termes de contraste et de résolution seront quant à eux présentés dans le chapitre 4.

Système d'acquisition et supports d'étude

3.1 Montage optique utilisé

Pour mettre en œuvre nos méthodes basées sur une illumination par ligne laser dans le proche infrarouge en réflectance, les premières expériences ont été réalisées sur le montage suivant :

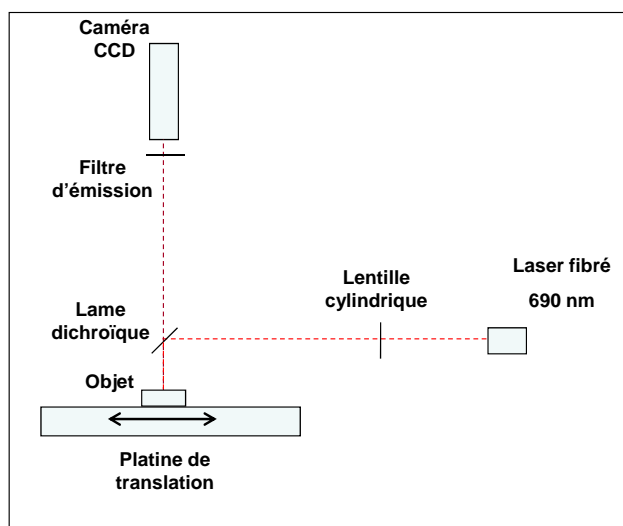


FIGURE 3.1 – Montage optique utilisé lors des expériences préliminaires.

La plupart des éléments de ce montage sont des éléments classiques utilisés dans des instruments d'imagerie moléculaire en rétrodiffusion. La source de lumière est un laser fibré à 690 nm (Intense HPD modèle 7404), cette longueur d'onde étant adaptée pour exciter plusieurs fluorophores dans le proche infrarouge. Nous utilisons aussi un filtre d'excitation centré à 690 nm de largeur 10 nm. La puissance du laser au niveau de l'échantillon est de 15 mW. Le capteur est une caméra CCD PCO Pixelfly avec une taille de capteur de 640x480 pixels. Malgré son efficacité quantique réduite pour les longueurs d'onde supérieures à 800 nm (de l'ordre de 5%), cette caméra offre un bon rapport qualité/prix. Le filtre de fluorescence utilisé lors des expériences sur fantômes est un filtre passe-haut Semrock Razoredge dont la longueur d'onde de coupure est à 808 nm et dont le profil de transmission est visible en figure

3.2. Celui-ci est adapté à l'ICG qui a été le fluorophore utilisé lors de cette étude (nous en parlerons plus en détail dans la suite de ce chapitre).

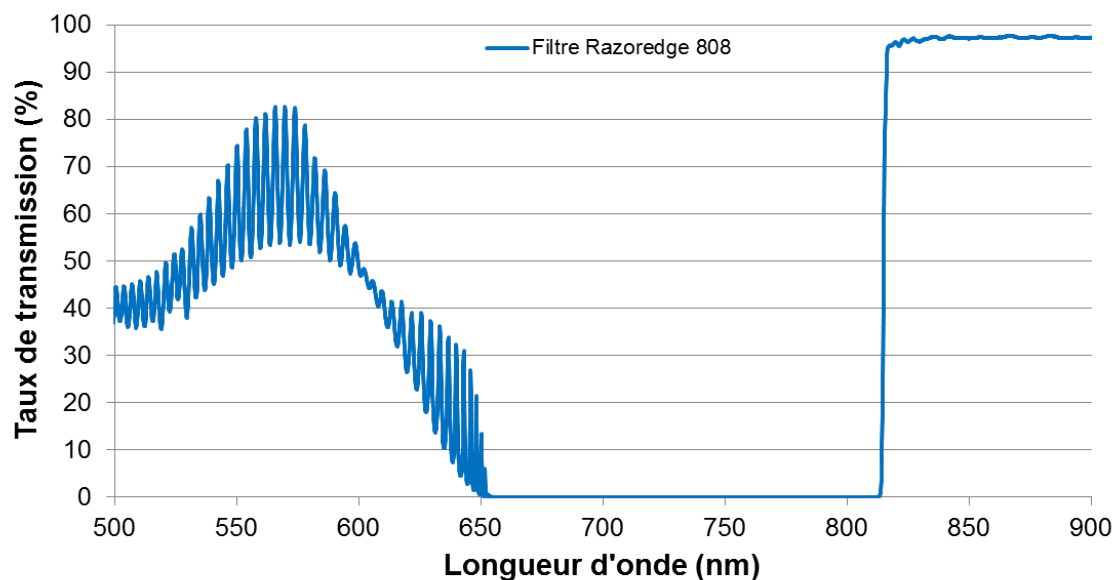


FIGURE 3.2 – Profil de transmission du filtre Semrock Razoredge 808 utilisé lors des expériences sur fantômes.

Les éléments spécifiques à notre méthode sont une lentille cylindrique qui forme la ligne laser ainsi que la platine de translation motorisée qui permet de déplacer l'objet d'étude pour faire des acquisitions à différentes positions. Nous avons tout d'abord utilisé un pas de translation de 1 mm, mais, pour améliorer nos résultats, nous avons décidé par la suite d'utiliser un pas de 100 μm . Avec la résolution de notre montage, ce pas correspond à la distance imagée sur un pixel. De cette manière, nous avons pu réduire la largeur de la bande de détection utilisée en détection localisée, augmentant ainsi la résolution des images obtenues avec cette méthode.

Les premières expériences ont été réalisées avec une lame dichroïque dont la longueur d'onde de coupure était à 800 nm comme on peut le voir sur la figure 3.1. Nous avons finalement décidé de la retirer du montage et d'utiliser la configuration schématisée en figure 3.3.

En effet, du fait de sa taille, la lame causait des problèmes pour imager correctement le champ vu par la caméra. De plus, l'une de nos méthodes tire parti des images acquises à la longueur d'onde d'excitation (notre méthode de modélisation du signal d'autofluorescence à partir du signal d'excitation). Retirer la lame dichroïque nous a donc permis de comparer de manière rigoureuse cette méthode avec les autres méthodes basées exclusivement sur l'utilisation des images de fluorescence. Nous avons décidé d'illuminer l'objet avec un angle d'environ 45° , les images de fluorescence étant acquises avec le filtre Semrock précédemment cité tandis que les images d'excitation sont acquises avec une simple densité optique. Sur cette dernière version du montage, nous avons aussi ajouté un degré de liberté au niveau du support de l'objet étudié : celui-ci permet les rotations, nous autorisant ainsi à faire des acquisitions avec différents sens de balayage.

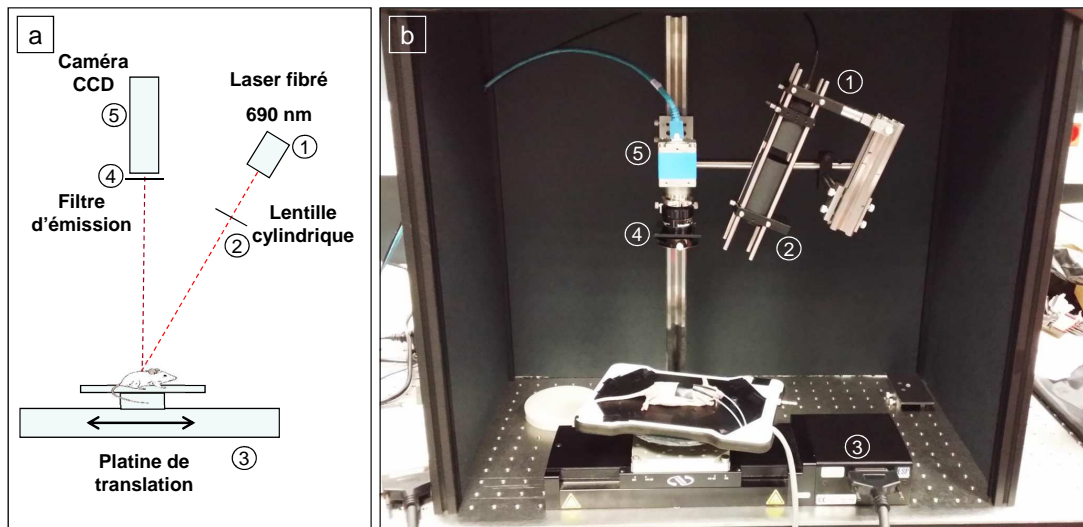


FIGURE 3.3 – Montage optique utilisé lors de l'étude.

On peut voir un exemple de quelques images prises à différentes positions de la ligne d'excitation sur la figure 3.4.

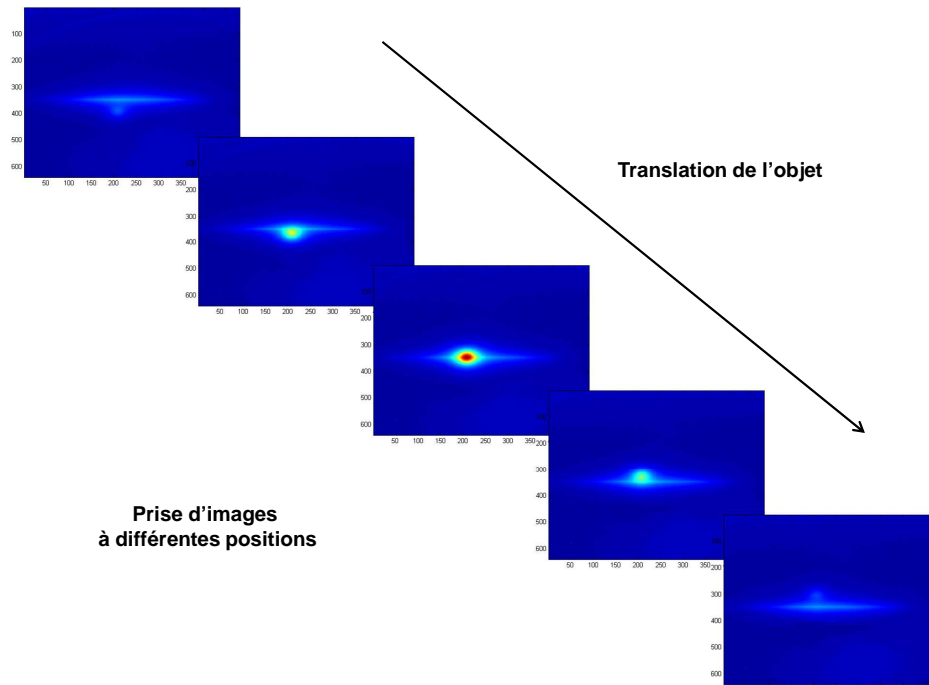


FIGURE 3.4 – Exemples d'images acquises à différentes positions au fur et à mesure de la translation de l'objet sous la ligne d'excitation.

3.2 Expériences sur fantômes

Avant de faire une validation de nos méthodes *in vivo*, notre étude a d'abord été réalisée sur des fantômes optiques qui vont être décrits dans cette section.

Un fantôme optique est un objet d'étude utilisé en imagerie optique qui permet de s'approcher des propriétés optiques des tissus biologiques^[98]. Ce type de support est très intéressant puisqu'il permet de simplifier les expérimentations en donnant un contrôle sur la géométrie de l'objet et sur ses propriétés optiques. Il ne remplace toutefois pas l'expérimentation *in vivo* qui, bien que plus coûteuse et fastidieuse, reste nécessaire du fait de l'impossibilité pour les fantômes optiques de reproduire correctement la structure complexe des tissus.

Un fantôme optique sera composé en général de trois éléments :

- une matrice ;
- des éléments diffusants ;
- des éléments absorbants.

Selon qu'on cherche à obtenir un fantôme liquide, solide ou bien semi-rigide, la matrice pourra être constituée de différents composants, comme de l'eau, du polyuréthane ou bien de la gélatine. L'eau offre l'avantage d'être transparente aux longueurs d'onde considérées et permet l'ajout de molécules organiques. Ce type de fantôme est donc intéressant pour les phases d'étude, tandis que les fantômes solides sont plus utilisés comme des outils de calibration et de tests de dispositifs. Pour les éléments diffusants, le choix se fera en général entre trois types de matériaux : des émulsions lipidiques (comme par exemple l'Intralipid^[99, 100, 101]), des poudres d'oxydes d'aluminium ou de titane, et des microbilles calibrées de latex ou de polystyrène. Les éléments absorbants pourront être quant à eux soit de l'hémoglobine pour simuler réellement les tissus biologiques, soit plus simplement de l'encre qui sera plus stable.

Il est important de noter qu'il n'existe pas encore de standards au niveau des fantômes optiques utilisés, plusieurs méthodes ayant été validées par différents laboratoires. Ceci rend la comparaison entre systèmes optiques difficile, les différences mesurées entre les groupes pouvant atteindre 50 % parfois^[102, 103]. Il est possible que cette standardisation des fantômes soit mise en place dans un futur proche, ce qui permettrait une comparaison plus rigoureuse des méthodes d'imagerie testées sur fantômes.

Lors de notre étude, nous avons pu tester les trois types de fantômes.

Les fantômes solides utilisés ont été des fantômes réalisés à partir de résine polyester^[104, 105]. Leur avantage est qu'ils se conservent très bien dans le temps et sont faciles à manipuler, mais ils n'ont pas la polyvalence des fantômes liquides ou semi-rigides qui eux permettent d'étudier facilement plusieurs configurations d'objets fluorescents. De plus, il est plus difficile d'obtenir précisément des propriétés optiques données sur ces fantômes solides.

Nous avons aussi utilisé des fantômes semi-rigides à base de gélatine alimentaire. L'avantage de ces fantômes est qu'ils sont le bon compromis entre les fantômes solides qui offrent

peu de possibilités de modifications une fois faits, et les fantômes liquides qui nécessitent un montage pour positionner les objets fluorescents à la profondeur désirée alors que les fantômes semi-rigides permettent d'insérer rapidement un ou des capillaires. Ils sont aussi intéressants dans la mesure où ils permettent de s'approcher de la consistance des tissus vivants. Ils peuvent donc servir de support d'apprentissage à l'utilisation des nouvelles techniques d'imagerie per-opératoire pour les chirurgiens^[106].

Toutefois, dans notre cas, ce type de fantômes présente plusieurs inconvénients : ils ne se conservent que peu de temps, ils sont difficilement reproductibles de manière rigoureuse, et ils peuvent se fissurer lors de l'insertion d'un capillaire, faussant ainsi l'information en profondeur. De plus, la gélatine utilisée entraîne la formation d'agrégats de fluorophore au sein du fantôme, ce qui nous empêche d'avoir un signal de fond homogène.

Nous avons donc décidé d'utiliser principalement des fantômes liquides afin d'améliorer la reproductibilité, la conservation du fantôme et pour avoir un contrôle plus précis sur le positionnement de nos objets fluorescents en profondeur dans le fantôme. Ces fantômes liquides sont réalisées avec de l'eau distillée comme matrice, de l'Intralipid comme élément diffusant, et de l'encre de Chine comme élément absorbant.

Les propriétés optiques utilisées lors de l'étude sont celles du sein (à savoir un coefficient d'absorption μ_a de $0,1 \text{ cm}^{-1}$ et un coefficient de diffusion réduit μ'_s de 10 cm^{-1}), celles-ci étant un bon compromis entre les différentes propriétés optiques auxquelles on peut être confronté dans nos applications.

Les propriétés optiques de ces fantômes sont vérifiées par le biais d'une mesure faite avec la chaîne d'acquisition TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*) disponible au laboratoire.

Le fluorophore utilisé lors de ces expériences sur fantôme était l'*Indocyanine Green* (ICG)^[44]. Il présente l'avantage d'émettre aux longueurs d'onde adaptées à l'imagerie dans le proche infrarouge, et, comme nous l'avons mentionné dans le premier chapitre, il est utilisé dans de nombreuses études car son injection est autorisée par la FDA. Il a toutefois des limitations assez fortes : il est non spécifique, la possibilité d'y greffer des ligands pour le ciblage est limitée, et ses propriétés optiques sont difficilement prévisibles une fois injecté de par ses facultés à se lier à des protéines plasmatiques ou à former des agrégats.

Afin de pallier ces limites, nous utilisons une forme de l'ICG encapsulée dans des nanoparticules lipidiques développées au CEA appelée ICG-LNP^[107, 108, 109]. Ces nanoparticules offrent à l'ICG une stabilité plus grande une fois injecté et de meilleures propriétés optiques : son rendement quantique est environ deux fois meilleur, et il peut rester stable beaucoup plus longtemps (plus de 40 jours).

Les spectres d'absorption et de fluorescence de l'ICG-LNP sont présentés sur la figure 3.5.

Les inclusions fluorescentes étudiées étaient des capillaires en verre d'1 mm de diamètre contenant de l'ICG à environ $3 \mu\text{M}$ dilué dans la même préparation que le fantôme afin de limiter au maximum les effets d'interface.

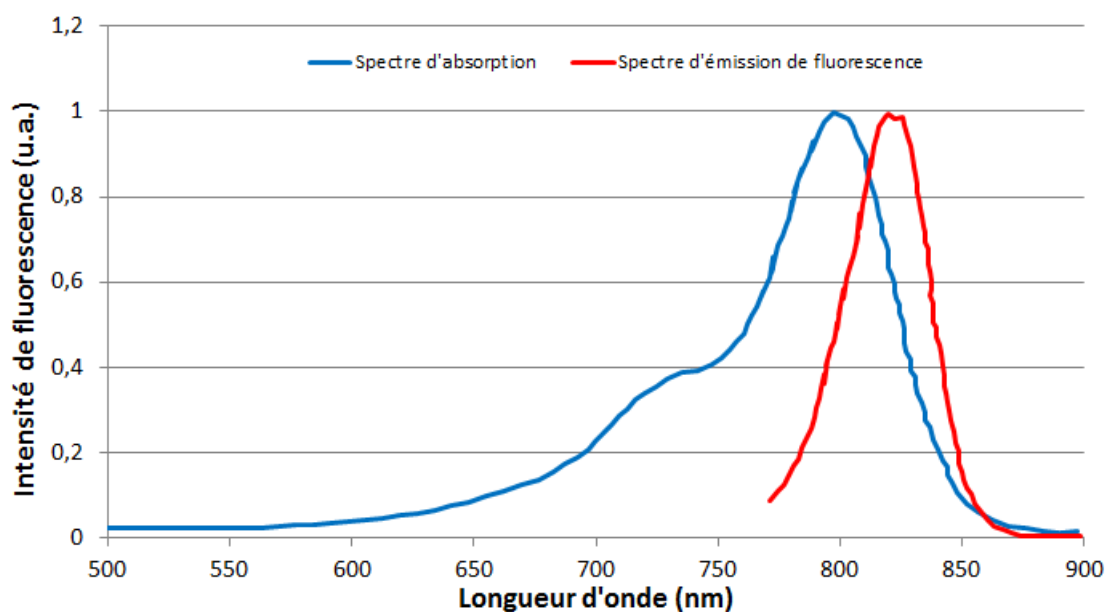


FIGURE 3.5 – Comparaison des spectres d'absorption (A) et d'émission de fluorescence (B) de l'ICG encapsulé dans des nanoparticules lipidiques^[107].

Pour l'auto fluorescence, nous avons ajouté un certain volume d'ICG à la préparation. Avec les fantômes semi-rigides, le niveau d'auto fluorescence était toutefois difficilement contrôlable, car il arrivait que des agrégats d'ICG se forment en surface. De plus, le rendement de fluorescence de l'ICG varie lorsque le fluorophore s'adsorbe sur des protéines, comme la gélatine. Nous avons toutefois considéré que les fantômes utilisés étaient suffisamment bons pour simuler correctement des tissus auto fluorescents lors des premiers essais. Ce problème n'était pas présent lors de l'étude sur fantômes liquides.

Lors de l'étude, deux niveaux d'auto fluorescence ont été utilisés. Ces deux niveaux de signal de fond ont été défini à partir de la référence [106].

Pour le niveau d'auto fluorescence réaliste, nous avons utilisé un ratio de concentrations entre l'inclusion et le fantôme d'environ 80 (ce ratio s'appuie sur le signal "équivalent ICG" de la peau qui est le signal médian par rapport aux autres organes présentés dans [106]).

Pour le niveau d'auto fluorescence plus important, nous avons utilisé un ratio de concentrations cinq fois plus faible. On obtient alors un signal "équivalent ICG" pour le fond environ 1,5 fois plus grand que le pire cas décrit dans [106]. Ce cas extrême nous permet de tester les limites de nos méthodes et pourrait s'apparenter au cas où le fluorophore aurait été injecté peu avant l'observation, entraînant alors un signal non spécifique important.

Les différentes configurations d'inclusions fluorescentes étudiées sont les suivantes :

- une inclusion simple placée à différentes profondeurs comprises entre 1 et 10 mm (non représenté).

- deux inclusions ayant la même concentration de fluorophore séparées latéralement de 5 mm et placées aux mêmes profondeurs comprises entre 1 et 8 mm (figure 3.6.a). Ce type de fantôme nous permet d'étudier l'amélioration en résolution latérale de nos différentes méthodes, les capillaires se confondant selon leur profondeur lorsqu'on utilise une illumination uniforme.

- une mire de résolution fluorescente schématisée dans la figure 3.6.b. Cette mire est un fantôme en résine polyester dans lequel on a inséré des morceaux de Plexiglass fluorescents dont le spectre d'émission de fluorescence pour une excitation à 690 nm est donné sur la figure 3.6.b. Cette mire est plongée à différentes profondeurs dans un fantôme liquide ayant des propriétés optiques adaptées pour diminuer au maximum les effets d'interface. Comme pour le fantôme précédent, nous pouvons étudier l'amélioration en résolution latérale de nos différentes méthodes, les signaux des inclusions de Plexiglass se confondant lorsqu'on augmente la profondeur de la mire avec une illumination uniforme.

- quatre inclusions ayant la même concentration de fluorophores séparées latéralement de 1 cm chacune et placées à 4 profondeurs différentes entre 1 et 4 mm (figure 3.6.c). Ce type de fantôme nous permet d'étudier la capacité de sectionnement optique de nos méthodes.

- un fantôme en résine polyester dans lequel on injecte le fluorophore à différentes concentrations à des distances plus ou moins proches. Ce fantôme nous permet d'étudier l'«effet d'écran» parfois observé dans des cas réels : une zone marquée émettant un signal de fluorescence fort peut occulter une zone proche émettant un signal de fluorescence plus faible à cause de la diffusion. Les deux configurations de concentrations qui seront présentées dans ce manuscrit sont schématisées sur la figure 3.6.d.

Pour donner un ordre de grandeur au niveau du temps total d'acquisition, pour les expériences d'amélioration du contraste, 80 images ont été acquises pour chaque profondeur considérée, avec des temps d'intégration variant entre 30 ms pour l'inclusion à 1 mm et 3 s pour l'inclusion à 1 cm. L'acquisition était automatisée de manière à attendre 1 s entre chaque acquisition pour s'assurer que le fantôme liquide était complètement immobile après la translation. Le temps total d'acquisition varie donc entre 82,4 s à 1 mm et 320 s à 1 cm.

Pour les expériences d'amélioration de la résolution avec la mire de fluorescence, des pas de translations de 100 μm ont été utilisés afin d'avoir accès à des bandes de détections plus fines. 400 images ont été acquises pour chaque profondeur considérée, avec des temps d'intégration variant entre 30 ms à 1 mm et 250 ms à 4 mm. Le temps total d'acquisition varie donc entre 412 s à 1 mm et 500 s à 4 mm.

Aucun photoblanchiment notable n'a été observé.

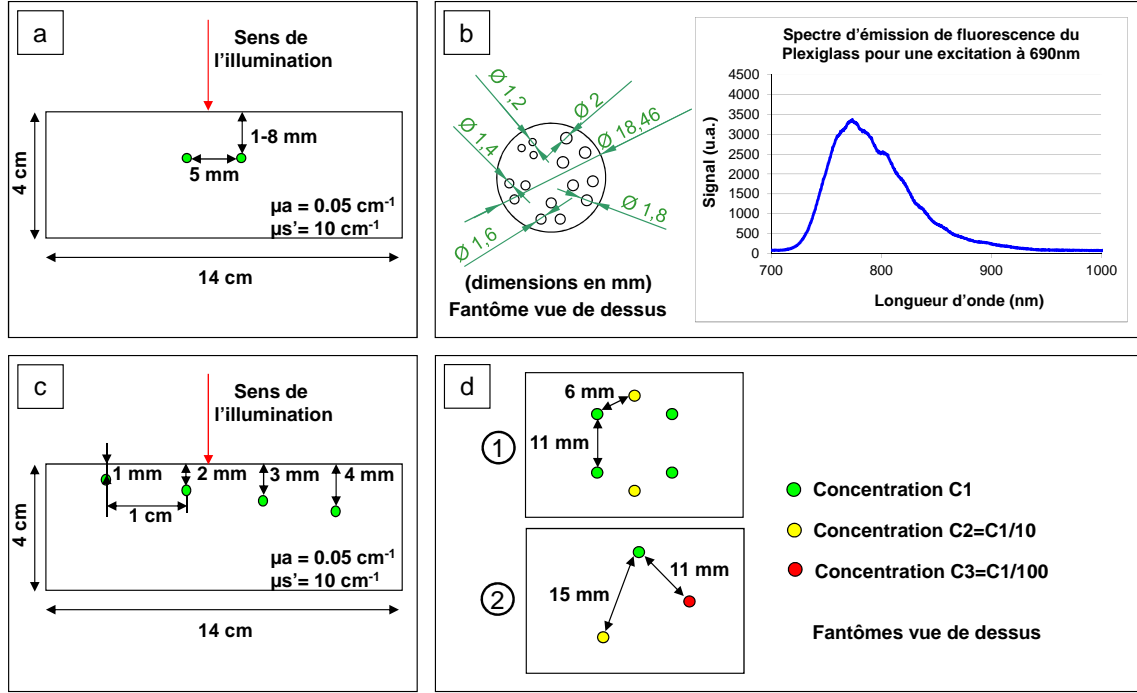


FIGURE 3.6 – Représentations schématiques des fantômes utilisés dans les différentes expériences.

3.3 Validation *in vivo* sur petit animal

La validation *in vivo* de nos méthodes a été faite sur petit animal. Les souris sont en effet un support indispensable pour acquérir des données réalistes. Pour ces expériences, les procédures sont conformes aux directives de l'Union Européenne et de la loi française concernant l'expérimentation animale. Tous les efforts possibles sont mis en oeuvre pour minimiser les souffrances de l'animal. La manipulation des souris s'effectue uniquement par des personnes formées, avec des outils stériles et approuvés par le comité d'utilisation et de soin des animaux de Grenoble.

Lors de nos expériences, les souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine et de xylazine, et elles sont maintenues à une température appropriée par le biais d'une plaque chauffante à environ 37° C.

Le protocole expérimental pour les expériences *in vivo* comporte certaines différences avec le protocole utilisé lors de l'étude sur fantômes. En effet, le fluorophore utilisé a été l'Alexa Fluor 700^[44] dont les spectres d'absorption et d'émission sont représentés en figure 3.7.

Nous avons donc modifié le système de filtrage du montage afin qu'il soit adapté à ce nouveau fluorophore. Nous avons ainsi remplacé le filtre d'émission Semrock Razoredge 808 précédemment décrit par un couple de filtres : un filtre coloré RG9 dont la fréquence de coupure se trouve à environ 700 nm, et un filtre interférentiel passe-bande Chroma centré à 725 nm et

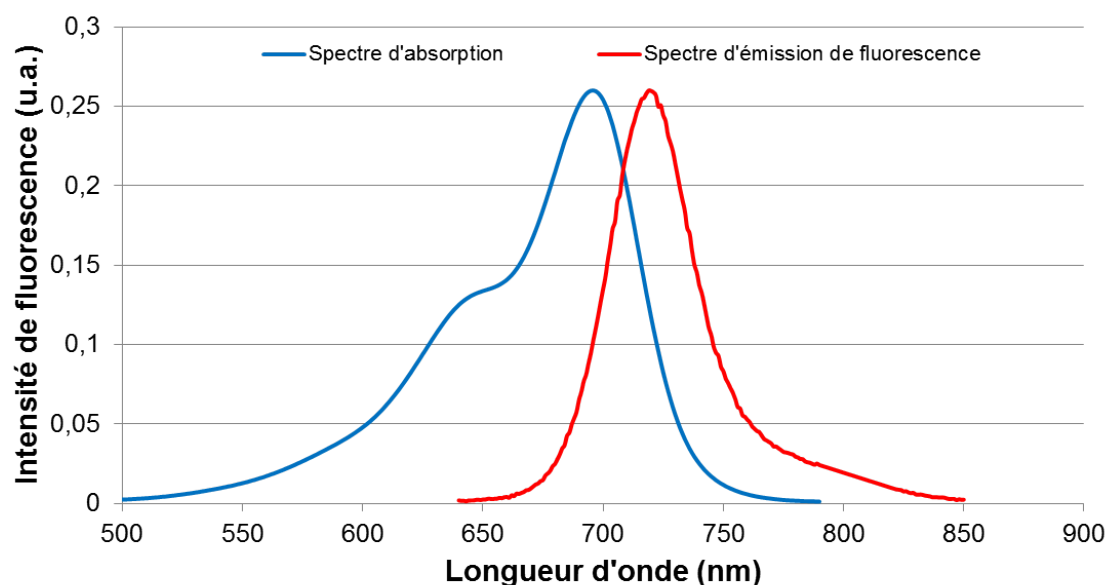


FIGURE 3.7 – Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'Alexa Fluor 700.

d'une largeur de 50 nm. Les spectres de transmission de ces filtres sont visibles sur la figure 3.8. La combinaison de ces deux filtres nous a permis d'utiliser des longs temps d'intégration lorsque cela était nécessaire sans que l'on observe de fuites d'excitation.

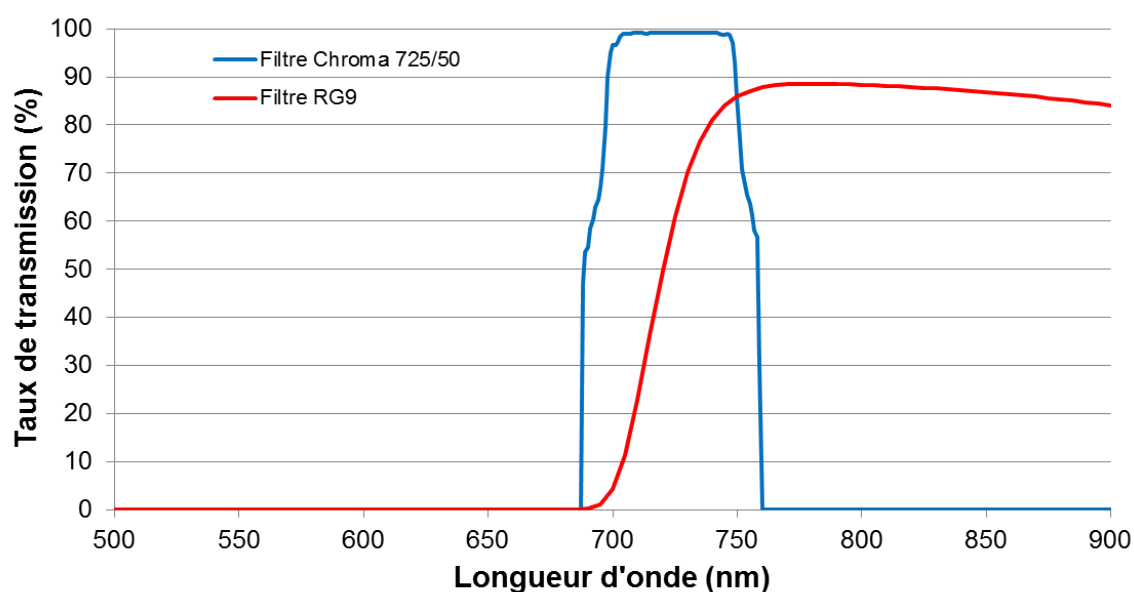


FIGURE 3.8 – Profils de transmission des filtres Chroma 725/50 et RG9 utilisés lors des expériences *in vivo*.

Pour cette validation *in vivo*, des capillaires contenant l'Alexa Fluor 700 ont été placés

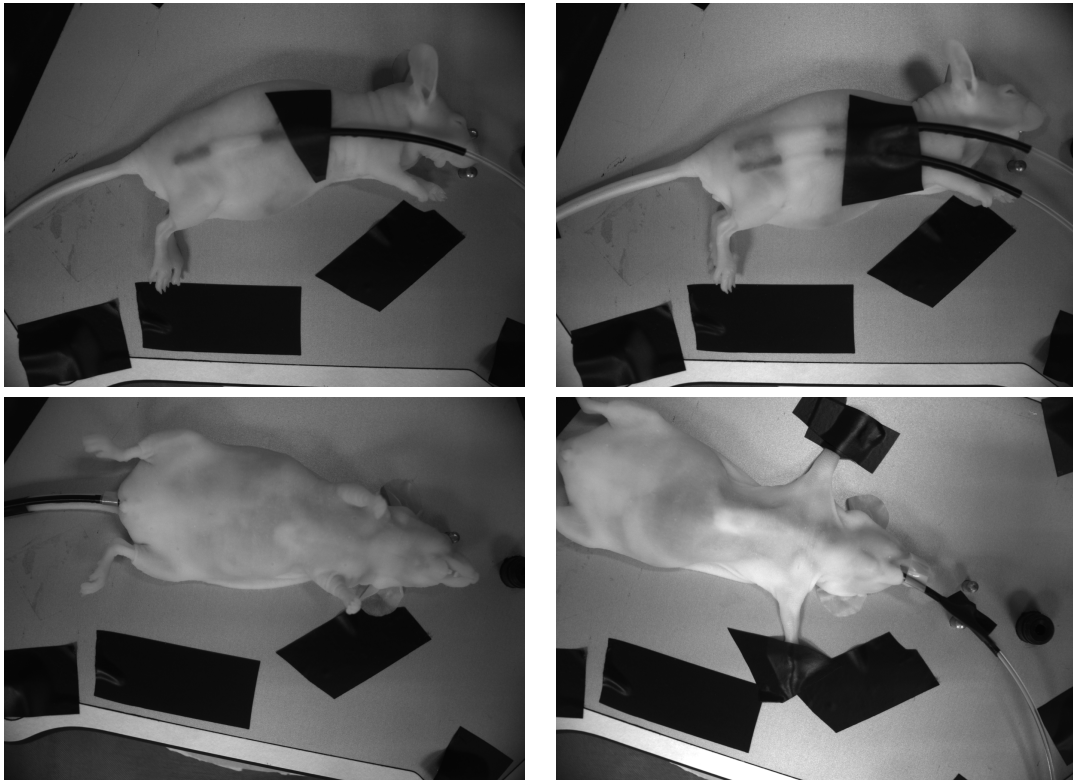


FIGURE 3.9 – Différentes configurations de capillaires étudiées en *in vivo*.

à différents endroits de la souris pour simuler plusieurs cas rencontrés en pratique. Quatre configurations ont été étudiées, celles-ci étant illustrées sur la figure 3.9 :

- un capillaire de $2\ \mu M$ positionné en sous-cutané, simulant un cas simple,
- deux capillaires de 2 et $20\ \mu M$ positionnés en sous-cutané et séparés de 5 mm , simulant un cas où le haut niveau de signal d'une zone marquée pourrait cacher une zone proche marquée plus faiblement (l'«effet d'écran» précédemment décrit),
- un capillaire de $20\ \mu M$ positionné au niveau de l'abdomen, simulant un cas de difficulté intermédiaire avec une inclusion en profondeur,
- un capillaire de $20\ \mu M$ positionné au niveau du thorax, simulant un cas complexe avec une inclusion en profondeur dans une zone très hétérogène optiquement.

Dans ce cas pratique, le fait d'illuminer l'objet d'étude avec un angle peut toutefois être problématique pour implémenter nos méthodes. Dans les cas où nous étudions des fantômes optiques plans comme le cas présenté en figure 3.4, la ligne laser est rectiligne. Cependant, dans les cas pratiques *in vivo* faits sur souris, la ligne est déformée par les contours de l'animal comme on peut le voir sur la figure 3.10. Nous parlerons de ce problème plus en détail lors de la présentation des résultats sur petit animal.

Pour donner un ordre de grandeur au niveau du temps total d'acquisition, pour les expé-

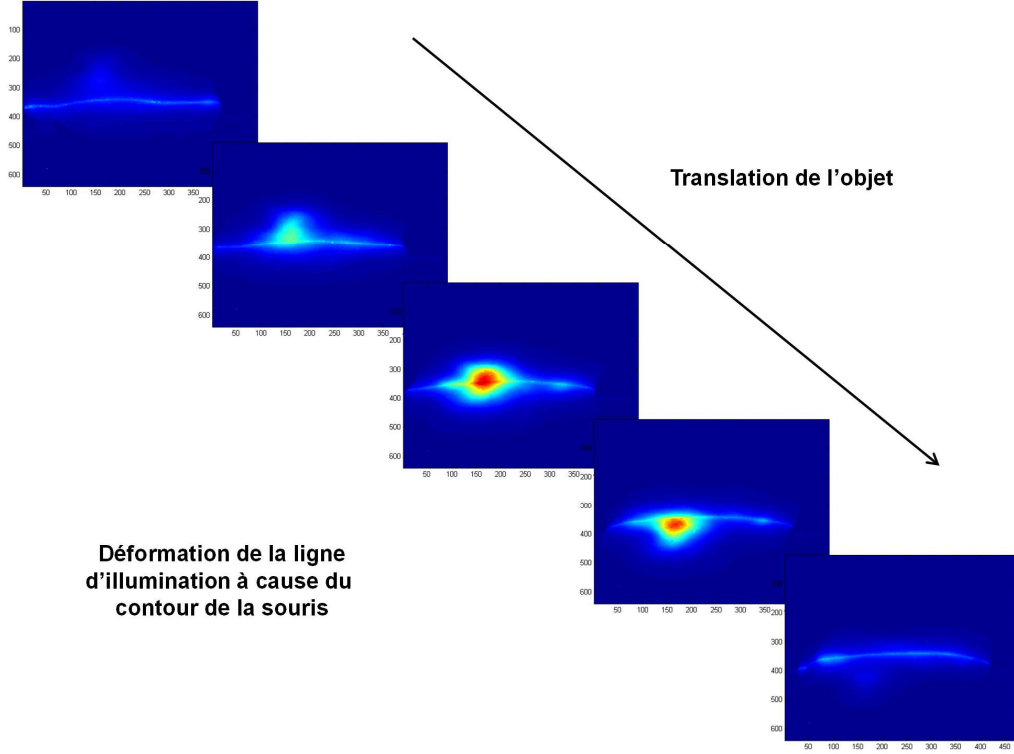


FIGURE 3.10 – Exemples d’images acquises à différentes positions au fur et à mesure de la translation du petit animal sous la ligne montrant la déformation de la ligne due au contour de la souris.

riences *in vivo*, nous avons aussi utilisé des pas de translations de $100\ \mu\text{m}$. 400 images ont été acquises pour chaque profondeur considérée, avec des temps d’intégration variant entre 200 ms pour le cas en sous-cutané et 2 s pour le cas du thorax. Le temps total d’acquisition varie donc entre 480 s pour le cas en sous-cutané et 1200 s pour le cas du thorax.

Là non plus aucun photoblanchiment notable n’a été observé.

3.4 Proposition d’amélioration du montage pour une implémentation en temps réel

Jusqu’à présent, les méthodes présentées dans ce manuscrit ont été implémentées dans une configuration classique d’imagerie moléculaire en rétrodiffusion, les traitements étant appliqués *a posteriori* sur la pile d’images acquises. Nous envisageons pour la suite de faire l’implémentation de ces traitements directement de manière optique par le biais d’un masque programmable qui serait placé au sein d’un montage à scanning bilatéral. Ce système de scanning est inspiré d’un système de microscopie confocale temps réel à scanning de ligne décrit par G.J. Brakenhoff en 1992^[110] dont on peut voir le schéma de base sur la figure 3.11. La différence fondamentale est que le microscope confocal capture la lumière venant du même

plan que le plan illuminé alors que nous pouvons être intéressés par la lumière de fluorescence provenant des plans extérieurs selon l'information recherchée. Le microscope confocal comporte donc une fente de détection alors que nous aurions l'écran programmable permettant de bloquer la lumière issue de différents endroits de l'objet observé.

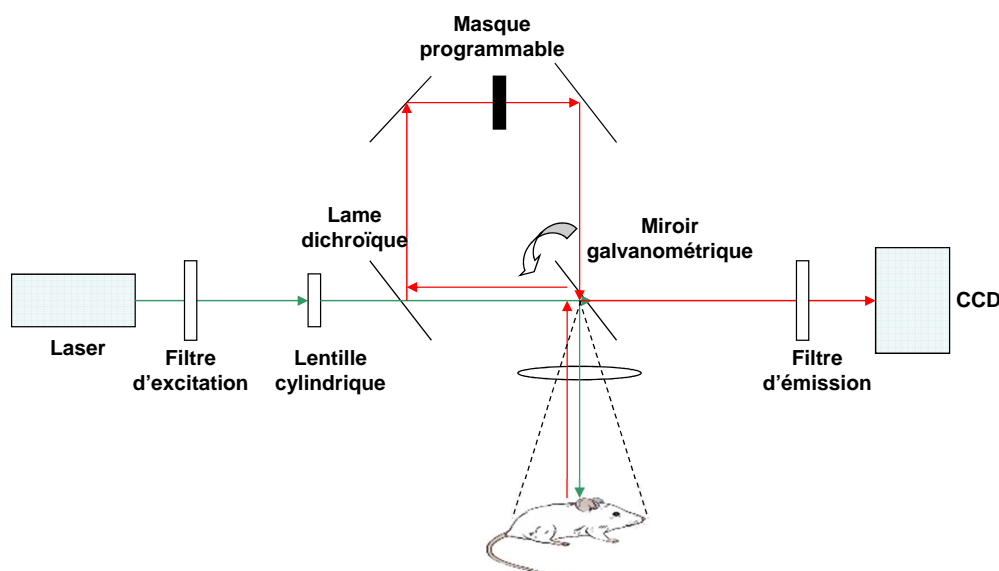


FIGURE 3.11 – Exemple de montage inspiré d'un système confocal à scanning bilatéral permettant de faire le masquage de la ligne directement lors de l'acquisition des images.

Parmi nos méthodes, la méthode de détection localisée simple serait la plus facilement implémentable. En effet, le masque utilisé pourrait être une simple fente mécanique, et l'acquisition de l'image en détection localisée serait faite de manière directe en synchronisant la durée d'intégration de la caméra avec la durée du balayage de la zone observée.

La méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage nécessiterait quant à elle deux balayages, un premier pour faire la détection sur la bande de pixels d'intérêt et un second pour faire la détection du voisinage contenant le signal à soustraire.

La méthode d'illumination structurée pourrait être implémentée en réalisant une modulation sinusoïdale du signal détecté qui serait synchronisée avec le balayage de l'objet.

Enfin, la méthode de modélisation du signal de fluorescence parasite par le signal d'excitation serait sans doute plus difficile à mettre en oeuvre en temps réel. D'une part, celle-ci nécessiterait une acquisition simultanée de l'image de fluorescence et de l'image à la longueur d'onde d'excitation, ce qui rendrait le montage optique plus complexe. D'autre part, il faudrait pouvoir implémenter la modélisation suffisamment rapidement pour atteindre les cadences nécessaires à une visualisation en temps réel.

Etude de l'amélioration du contraste et de la résolution sur fantômes et validation *in vivo* sur petit animal

Dans ce chapitre, nous allons présenter les différents résultats obtenus avec l'ensemble de nos méthodes.

Nous verrons tout d'abord les résultats obtenus avec la technique de masquage de la ligne d'excitation qui était initialement prévue afin de comprendre pourquoi celle-ci n'apporte pas les améliorations escomptées. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus avec les autres méthodes et leurs apports au niveau du contraste et de la résolution.

Nous présenterons d'abord les résultats obtenus sur les différents fantômes présentés dans le chapitre précédent dans deux conditions d'autofluorescence, puis nous présenterons les résultats obtenus en *in vivo* sur petit animal. Quatre cas pratiques de difficulté croissante seront décrits.

Enfin, nous montrerons quelques résultats intéressants concernant des essais de correction des variations d'absorption par le biais de notre technique de modélisation de la fluorescence par l'excitation.

4.1 Résultats préliminaires

Ces premiers résultats concernent la technique de masquage de la ligne d'excitation prévue à l'origine. Nous allons ainsi voir pourquoi celle-ci n'est pas adaptée à notre problématique.

Dans cette première expérience, l'objet étudié est un fantôme en résine dans lequel on insère une inclusion fluorescente. Le fantôme ne présente pas d'autofluorescence, le signal parasite est le signal d'excitation mal filtré. La comparaison entre la reconstitution brute et la reconstitution faite à partir des images masquées est montrée en figure 4.1 (images partie haute de la figure).

On remarque sur ces premières expériences que le contraste entre la fluorescence d'intérêt et le signal de fond de l'image reconstituée brute (comparable à une image obtenue en illuminant l'objet de manière uniforme) augmente après traitement d'un facteur 1,5.

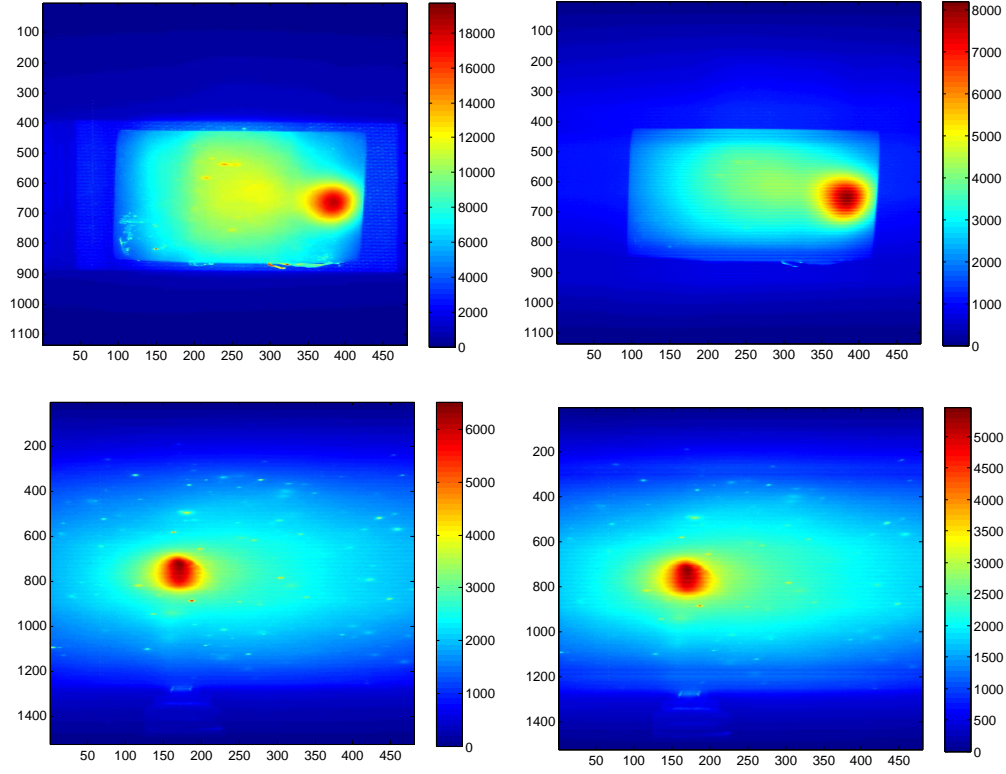


FIGURE 4.1 – Exemples d’images obtenues avant masquage (à gauche) et après (à droite), dans le cas d’un fantôme sans autofluorescence (en haut) et avec (en bas).

Après ces premiers résultats, nous avons fait le même type d’expérience sur des fantômes autofluorescents afin de voir l’apport du masquage pour la réduction de l’autofluorescence. Le même protocole expérimental a été suivi pour la reconstitution des images. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.1 (images partie basse de la figure).

Comme on peut le constater, le masquage n’améliore pas le contraste, nous observons même une faible diminution de celui-ci. Nous expliquons ceci par l’étendue spatiale de l’autofluorescence.

En effet, dans les premières expériences, le signal parasite était un signal d’excitation mal filtré. Celui-ci était relativement localisé dans l’image, et il était possible de le supprimer sans que cela n’enlève par la même occasion trop de signal de fluorescence d’intérêt. Cependant, dans les expériences sur des fantômes autofluorescents, on remarque que le signal parasite est beaucoup moins localisé au niveau de la ligne d’excitation que précédemment. De ce fait, supprimer le signal de la ligne d’excitation et proche de celle-ci ne suffit plus à retirer suffisamment de signal parasite sans retirer par la même occasion la fluorescence d’intérêt.

Sur la figure 4.2, on a d’une part comparé les profils d’intensité de la fluorescence et de l’excitation parasite dans le cas du fantôme rigide non autofluorescent, et d’autre part les profils d’intensité de la fluorescence et de l’autofluorescence dans le cas du fantôme semi-rigide

autofluorescent.

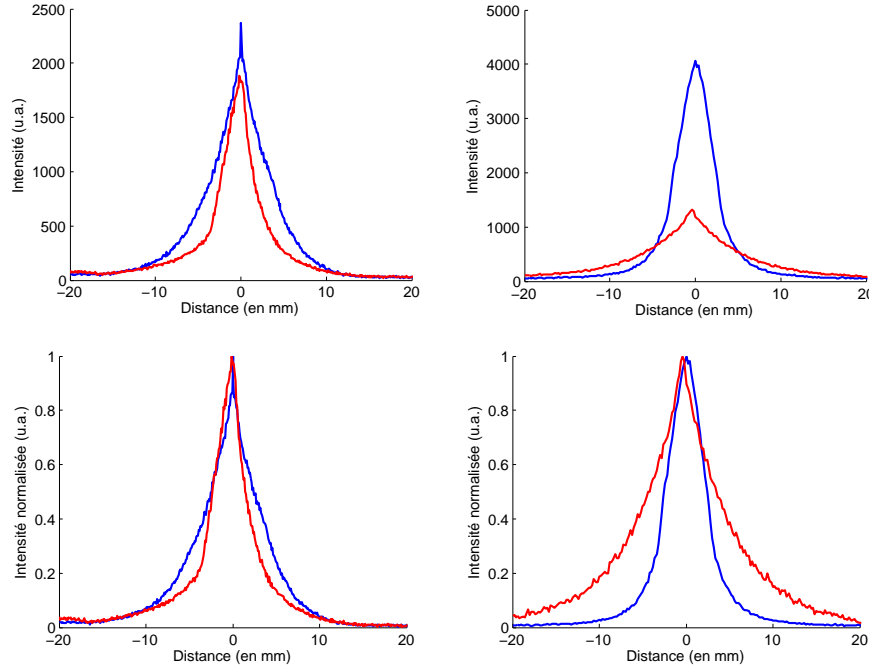


FIGURE 4.2 – Comparaison des profils d'intensité du signal de fluorescence (—) et du signal d'excitation parasite (—) à gauche, et des profils d'intensité du signal de fluorescence (—) et du signal d'autofluorescence (—) à droite (profils bruts en haut et normalisés en bas).

On voit bien sur ces deux figures que les signaux parasites n'ont pas des profils comparables : le profil de l'excitation qui venait parasiter les images des expériences préliminaires est moins large que celui de la fluorescence d'intérêt. Ainsi, même si l'excitation était non négligeable en termes d'intensité par rapport à la fluorescence d'intérêt, il était possible de la diminuer fortement par masquage de la ligne. A l'inverse, pour les fantômes autofluorescents, même si le signal parasite d'autofluorescence est peu intense, le fait qu'il présente un profil plus large que celui de la fluorescence d'intérêt nous empêche d'avoir de meilleurs résultats avec un masquage de la ligne.

Des courbes d'évolution du contraste en fonction de l'étendue du masque ont été établies par le biais de simulations reproduisant nos conditions expérimentales (figure 4.3). Ces simulations confirment le fait que le masquage n'est pas adapté pour réduire les effets de l'autofluorescence, celui-ci n'ayant des effets bénéfiques que dans des cas où les propriétés optiques du milieu n'ont plus de sens physique. La définition du contraste est pour cette figure différente de celle précédemment utilisée au chapitre 2, on le définit alors comme

$$C = \frac{A + F + L}{A + L} \quad (4.1)$$

Avec A le signal parasite d'autofluorescence, L le signal parasite de fuite d'excitation, et

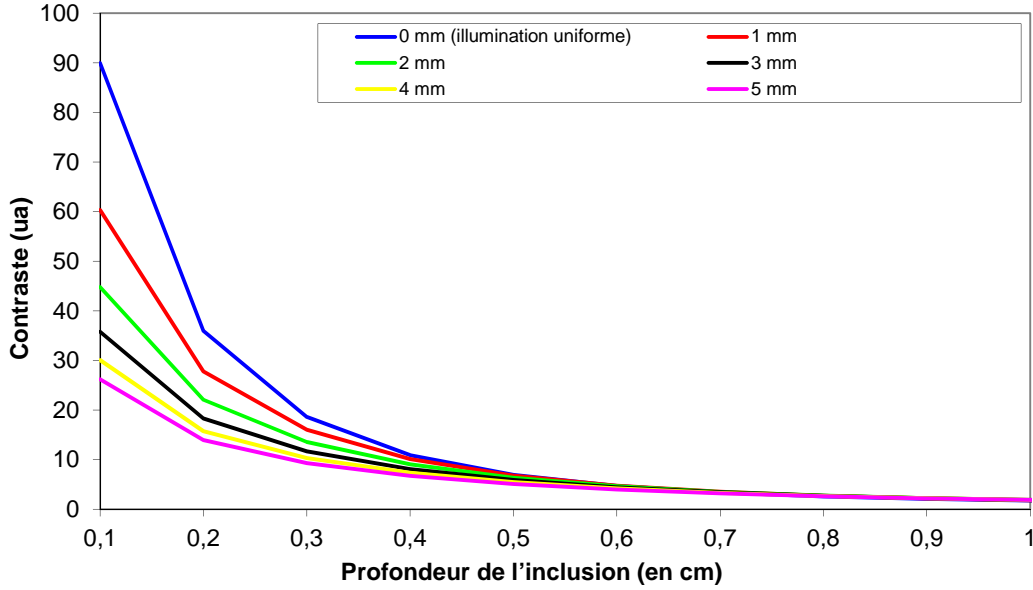


FIGURE 4.3 – Comparaison de l'évolution du contraste pour une illumination uniforme et pour une illumination par ligne que l'on masquerait avec différentes tailles de masque : illumination uniforme (—), masque d'1 mm (—), masque de 2 mm (—), masque de 3 mm (—), masque de 4 mm (—), masque de 5 mm (—).

F le signal de fluorescence d'intérêt.

Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus avec nos autres méthodes décrites dans le chapitre 2, à savoir les deux méthodes de détection localisée, la méthode d'illumination structurée et la méthode de modélisation du signal parasite par le signal d'excitation. Pour chacune des méthodes, nous allons montrer les résultats obtenus avec les différents fantômes en termes de contraste et de résolution. Nous donnerons tout d'abord les images obtenues en illumination uniforme afin de donner un aperçu des problèmes rencontrés avec cette modalité. Nous donnerons ensuite les résultats obtenus avec une autofluorescence réaliste et relativement faible. Nous présenterons enfin les limites de nos méthodes en présence d'une autofluorescence plus importante.

Les niveaux d'autofluorescence ont été choisis à partir de la référence [106].

Pour le niveau d'autofluorescence réaliste, nous avons pris un ratio de concentrations entre l'inclusion fluorescente et le fond d'environ 80 (en nous basant sur le signal "équivalent ICG" de la peau, on a alors un ratio médian par rapport aux différents organes présentés dans [106]).

Pour le deuxième niveau d'autofluorescence étudié, nous avons décidé d'utiliser un ratio de concentrations 5 fois inférieur à celui du niveau précédent. On a alors un niveau d'autofluorescence en "équivalent ICG" 1,5 fois plus grand que le pire cas décrit dans [106]. Ce cas extrême nous permet toutefois de positionner et de tester nos méthodes par rapport à l'existant. De plus, un tel cas pourrait s'apparenter à l'étude de la fluorescence peu après injection du fluorophore où une fluorescence non spécifique importante vient alors perturber le signal.

4.2 Amélioration du contraste : étude avec une inclusion unique à différentes profondeurs

Pour juger la qualité de la détection sur nos images et faire une comparaison des différentes méthodes étudiées, nous utiliserons à présent la définition du contraste déjà donnée dans le chapitre 2 de ce manuscrit :

$$C = \frac{\langle I_T \rangle - \langle I_N \rangle}{\langle I_T \rangle + \langle I_N \rangle} \quad (4.2)$$

où $\langle I_T \rangle$ et $\langle I_N \rangle$ sont respectivement les intensités moyennes dans une zone cible T où se trouve la fluorescence d'intérêt et dans une zone neutre N (où l'on a uniquement des signaux parasites tels que l'autofluorescence).

4.2.1 Difficultés rencontrées en illumination uniforme

Pour montrer l'influence de la profondeur et de l'autofluorescence sur le contraste observé en illumination uniforme, nous allons tout d'abord montrer, sur les figures 4.4 et 4.5, les images obtenues pour une inclusion fluorescente située à différentes profondeurs et pour plusieurs niveaux d'autofluorescence à une profondeur donnée de 3 mm.

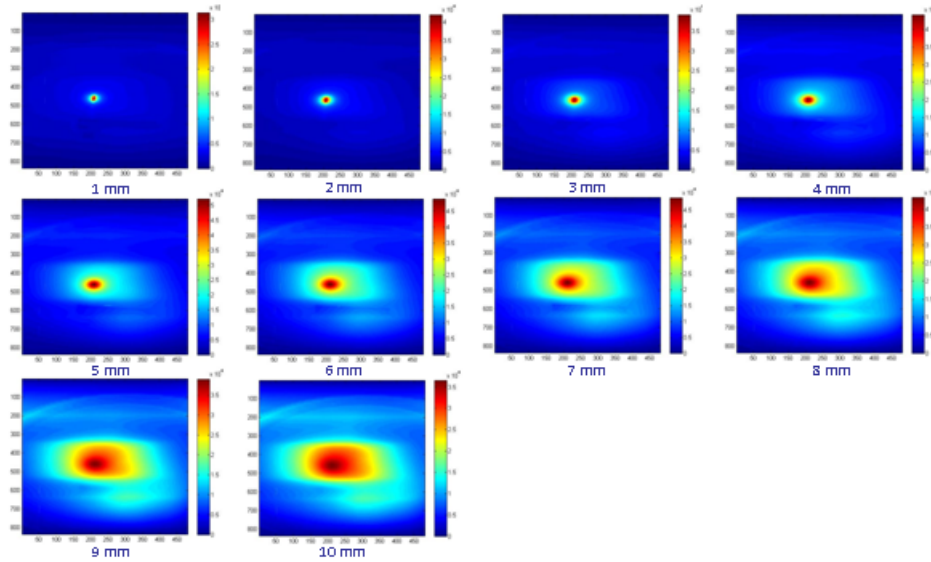


FIGURE 4.4 – Images de fluorescence acquises avec une illumination de type uniforme avec une inclusion à 10 profondeurs (entre 1 et 10 mm) pour un niveau d'autofluorescence donné.

On voit bien sur ces figures que, lorsque l'inclusion n'est pas située trop profondément ou que l'autofluorescence est suffisamment faible, il est possible de la détecter de manière tout à

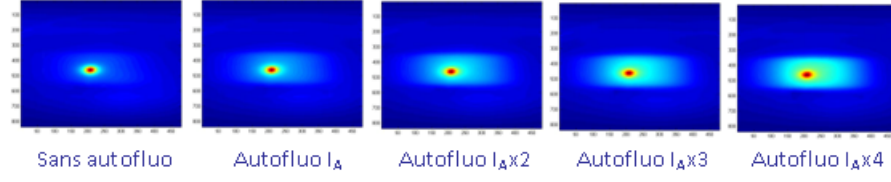


FIGURE 4.5 – Images de fluorescence acquises avec une illumination de type uniforme avec une inclusion à une profondeur donnée (3 mm) et cinq niveaux d'autofluorescence croissants.

fait convenable. Cependant, dès qu'on atteint une certaine profondeur ou pour une autofluorescence trop importante, la détection devient plus problématique. Si l'on prend l'exemple de l'inclusion à 3 mm, le contraste est de 0,5 environ pour le niveau d'autofluorescence le plus bas, mais il n'est plus que de 0,18 environ pour un même niveau d'autofluorescence mais une profondeur de 10 mm. Pour une même profondeur mais un niveau d'autofluorescence cinq fois plus important, il serait de 0,3 environ.

4.2.2 Fantômes avec une faible autofluorescence

Pour étudier l'amélioration apportée par nos méthodes par rapport à l'illumination uniforme dont les limites ont été évoquées dans la section précédente, nous avons effectué une étude poussée sur des fantômes liquides avec une inclusion positionnée à dix profondeurs (de 1 à 10 mm) pour un même niveau d'autofluorescence réaliste tel que décrit précédemment.

Les premiers résultats présentés sur la figure 4.6 sont ceux obtenus avec la détection localisée. Sur la figure de gauche, on voit tout d'abord la comparaison entre les contrastes obtenus aux différentes profondeurs avec l'illumination uniforme (courbe bleue) et avec la détection prise sur l'excitation (courbe rouge). Sur la figure de droite, on voit l'amélioration du contraste en fonction de la distance entre la bande d'excitation et la bande de détection.

Notons tout d'abord que, pour toutes les profondeurs considérées, la méthode de détection localisée améliore le contraste par rapport à l'illumination uniforme. Le gain observé est d'un facteur 1,4 pour une inclusion à 1 mm et monte à 1,8 pour une inclusion à 1 cm. On remarque ensuite qu'il existe un lien entre l'amélioration du contraste et la distance sources-détecteurs utilisée : plus l'inclusion observée est profonde, plus la distance sources-détecteurs utilisée doit être grande pour avoir le meilleur contraste. On voit ainsi que, lorsque l'inclusion est à 1 mm de profondeur, le gain est maximum pour une détection faite directement sur l'excitation, tandis que dans le cas où l'inclusion est à 1 cm, le gain est maximum en faisant la détection sur une bande de pixels située à 4 mm de l'excitation.

Sur la figure 4.7, on a présenté les résultats obtenus avec la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage. Vingt tailles de voisinage ont été considérées pour le calcul du signal à soustraire.

Si l'on se limite à une taille de voisinage égale à celle de la bande de détection choisie, on

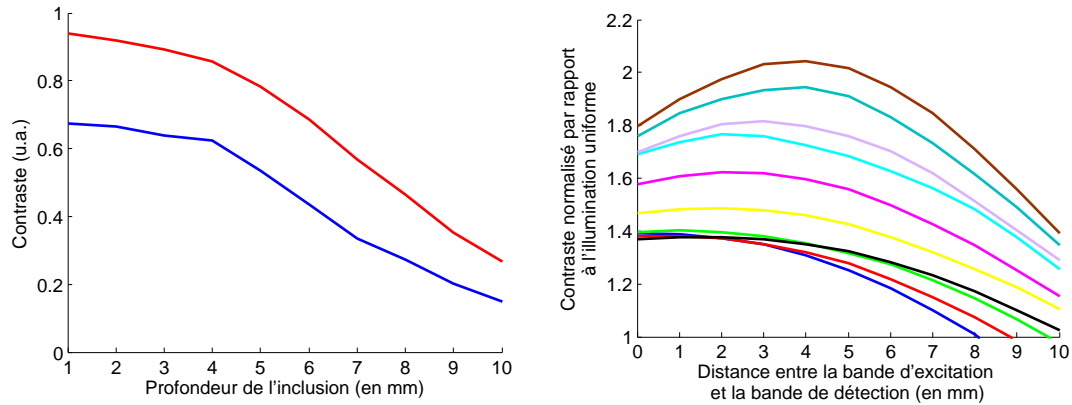


FIGURE 4.6 – A gauche : Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme (—) et en détection localisée simple sur l'excitation (—); A droite : Evolution du contraste (normalisé par rapport à l'illumination uniforme) en détection localisée simple en fonction de l'écart entre la ligne d'excitation et la ligne de détection : inclusion à 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).

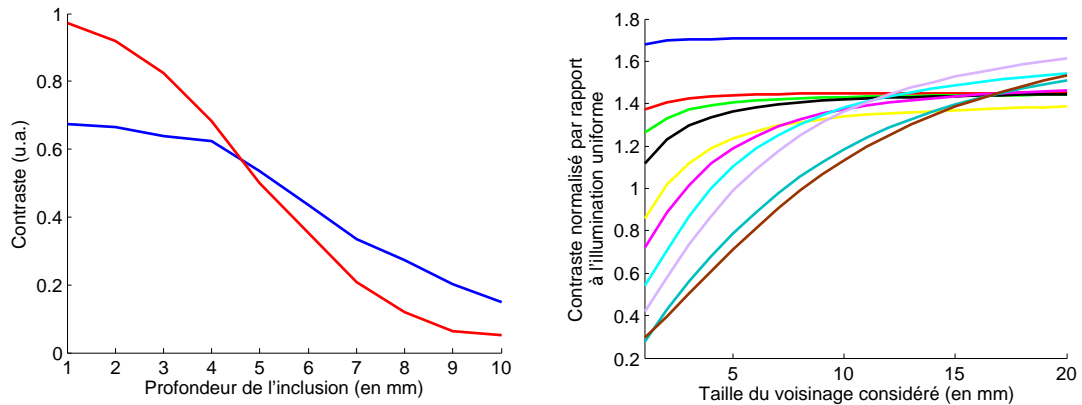


FIGURE 4.7 – A gauche : Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme (—) et en détection localisée avec soustraction du voisinage immédiat (—); A droite : Evolution du contraste (normalisé par rapport à l'illumination uniforme) en détection localisée avec soustraction du voisinage en fonction de la taille du voisinage : inclusion à 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).

ne voit une amélioration du contraste que pour les quatre premiers millimètres. Passée cette profondeur, le signal de fluorescence observé ayant une étendue spatiale trop large entraîne une surestimation du signal de fluorescence parasite à soustraire. On voit en revanche qu'en choisissant des voisinages plus grands pour l'estimation du signal parasite, il est possible d'améliorer le contraste pour les 10 profondeurs. On peut noter qu'il existe un lien entre la taille du voisinage optimal et la profondeur à laquelle se situe l'inclusion : plus l'inclusion est

enfouie profondément, plus le voisinage considéré doit être étendu spatialement pour obtenir le gain maximum au niveau du contraste. En effet, pour l'inclusion à 1 mm de profondeur, le gain au niveau du contraste est le même quelle que soit la taille du voisinage considéré alors que, pour l'inclusion à 1 cm, le gain est d'un facteur 0,3 lorsque le voisinage a une taille d'1 mm mais il est de 1,5 pour un voisinage de 20 mm.

Les résultats obtenus avec la méthode de modélisation du signal par l'excitation sont présentés sur la figure 4.8. On y compare les contrastes observés aux dix profondeurs avec l'illumination uniforme, la modélisation utilisant les paramètres locaux (paramètres spécifiques à chaque position d'excitation), et la modélisation utilisant les paramètres globaux (valeur moyenne des paramètres sur toutes les positions d'excitation).

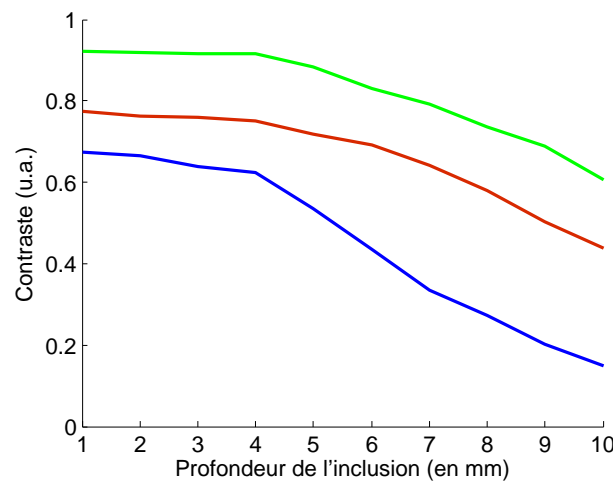


FIGURE 4.8 – Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme (—), avec la modélisation avec les paramètres locaux (—) et avec la modélisation avec les paramètres globaux (—).

On voit clairement l'amélioration de contraste apportée par la méthode de modélisation : pour chacune des profondeurs, le contraste est amélioré par rapport à l'illumination uniforme, que l'on utilise les paramètres de modélisation locaux ou bien globaux. Dans le cas simple où l'on n'a qu'une inclusion, on remarquera qu'il est plus intéressant d'utiliser les paramètres globaux. En effet, le gain observé avec les paramètres locaux varie entre un facteur 1,2 à 1 mm et 3,1 à 1 cm alors qu'il varie entre 1,4 et 4,4 lorsqu'on utilise les paramètres globaux.

Enfin, les contrastes obtenus aux 10 profondeurs en fonction de la fréquence spatiale d'illumination avec notre méthode d'illumination structurée sont présentés sur la figure 4.9.

On remarque tout d'abord que l'on améliore le contraste observé par rapport à l'illumination uniforme pour toutes les profondeurs, le gain lorsqu'on se place à la fréquence optimale variant entre 1,5 à 1 mm et 3,7 à 1 cm. On voit aussi qu'il existe un lien évident entre la profondeur de l'inclusion observée et la fréquence d'illumination à partir de laquelle le contraste n'est plus amélioré mais commence à chuter : lorsque l'inclusion est à 1 mm, le contraste minimum est atteint pour une fréquence de $0,35 \text{ mm}^{-1}$ alors qu'il est atteint dès $0,09 \text{ mm}^{-1}$ lorsque l'inclusion se situe à 1 cm de profondeur. Ceci découle de la capacité de sectionnement

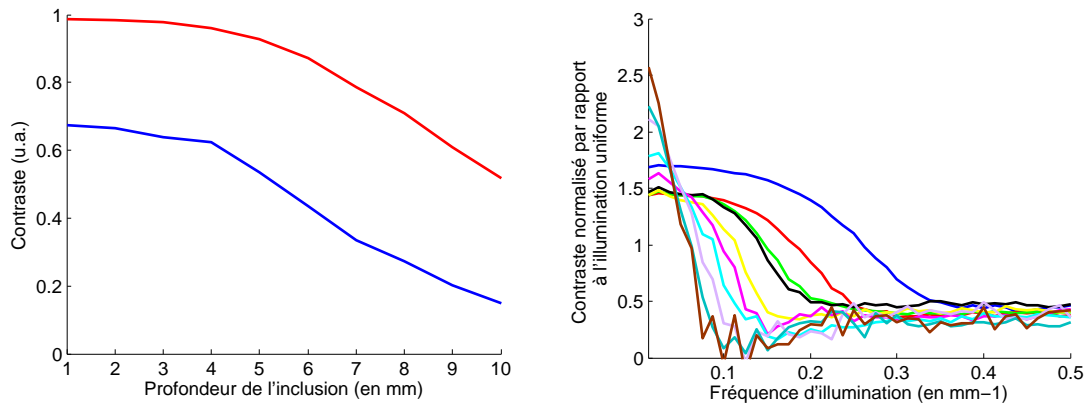


FIGURE 4.9 – **A gauche : Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme (—) et en illumination structurée à la fréquence optimale (—) ; A droite : Evolution du contraste (normalisé par rapport à l'illumination uniforme) en illumination structurée en fonction de la fréquence spatiale : inclusion à 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).**

optique de la technique. Il faut toutefois garder à l'esprit que ces valeurs sont correctes dans le cas de notre fantôme (propriétés optiques du sein et peu d'autofluorescence) mais elles seraient différentes pour un objet avec d'autres propriétés optiques.

La figure 4.10 récapitule les résultats obtenus avec les différentes méthodes présentées dans ce chapitre.

On voit bien qu'il est possible d'améliorer le contraste obtenu en illumination uniforme pour toutes les profondeurs envisagées, la méthode optimale dépendant de la profondeur. Pour les profondeurs supérieures à 5 mm, il est plus intéressant d'utiliser la méthode d'illumination structurée ou bien la méthode de modélisation par l'excitation. Toutefois, si l'on se contente d'observer des inclusions peu profondes, les méthodes de détection localisées offrent des performances comparables tout en étant beaucoup plus simples à implémenter en temps réel puisqu'elles ne nécessitent pas ou peu de traitement.

A titre de comparaison, nous avons présenté sur les figure 4.11 et 4.12 les images obtenues en illumination uniforme et autres méthodes pour une inclusion à 1 mm et à 10 mm.

Dans le cas de l'inclusion à 1 mm, on voit que les améliorations au niveau du contraste sont toutes relativement comparables. Seule la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage semble plus intéressante puisqu'elle permet d'améliorer en plus fortement la résolution, l'effet de la diffusion sur la forme du capillaire étant quasi totalement corrigé.

Dans le cas de l'inclusion à 10 mm, on retrouve le fait que les techniques de détection localisée offrent un gain en contraste sensiblement plus faible que les autres techniques.

Si les techniques de modélisation par l'excitation permettent d'obtenir un bon contraste,

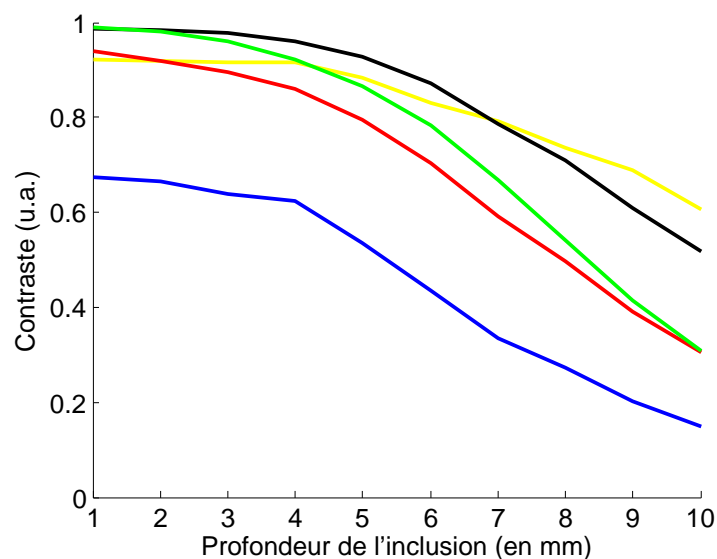


FIGURE 4.10 – Comparaison entre le contraste obtenu avec l'illumination uniforme (—), la détection localisée simple avec une distance de détection optimisée (—), la détection localisée avec soustraction du voisinage optimisée (—), l'illumination structurée avec la fréquence spatiale optimisée (—) et la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux (—).

on remarque tout de même l'influence du sens du balayage de la ligne. Nous verrons dans la suite de ce manuscrit lorsque nous présenterons les améliorations au niveau de la résolution qu'il est possible d'utiliser deux balayages perpendiculaires et de combiner les résultats pour diminuer les effets du sens de balayage.

La technique d'illumination structurée offre quant à elle les meilleures performances tant qu'on limite notre détection à la zone de validité précédemment décrite.

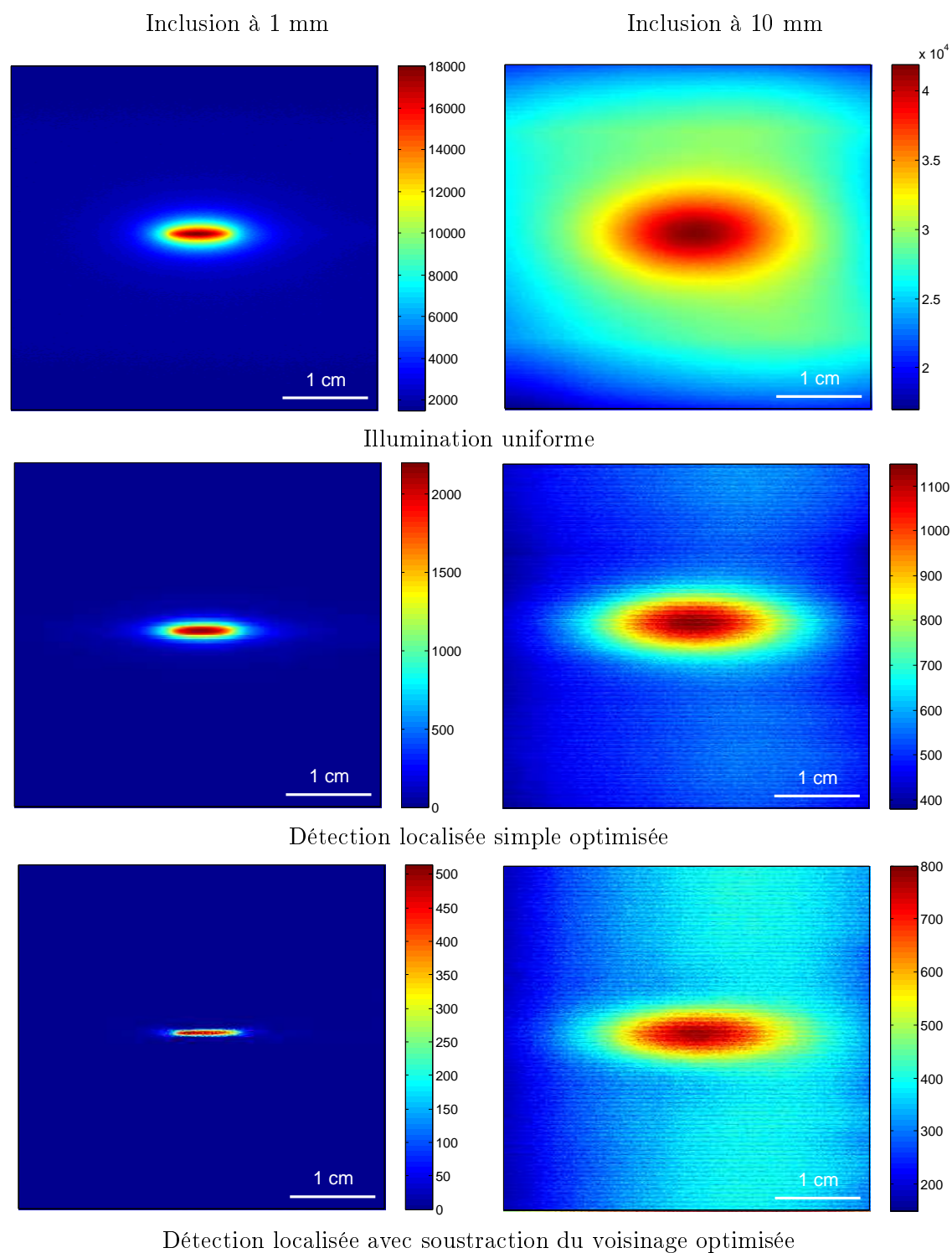


FIGURE 4.11 – Exemples d’images obtenues avec l’illumination uniforme et les méthodes de détection localisée pour une inclusion située à 1 mm (à gauche) et à 10 mm (à droite) de profondeur ; l’échelle de couleur des images est normalisée sur les valeurs minimum et maximum.

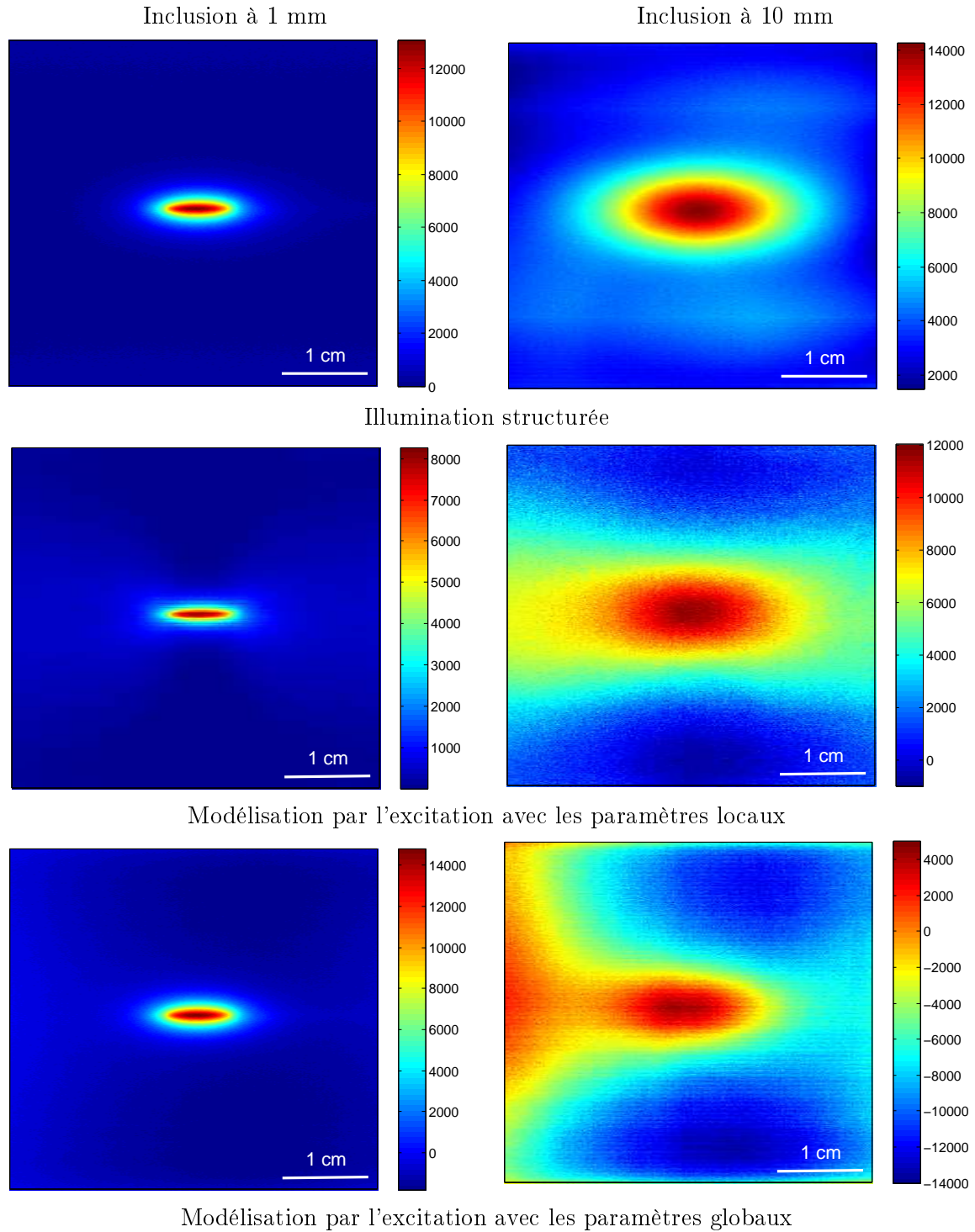


FIGURE 4.12 – Exemples d’images obtenues avec l’illumination structurée et la méthode de modélisation du signal parasite par l’excitation (paramètres locaux et globaux) pour une inclusion située à 1 mm (à gauche) et à 10 mm (à droite) de profondeur ; l’échelle de couleur des images est normalisée sur les valeurs minimum et maximum.

4.2.3 Fantômes avec une forte autofluorescence

Après ces premiers résultats obtenus avec un niveau d'autofluorescence réaliste, nous allons présenter, dans cette section, l'étude faite avec une inclusion à différentes profondeurs immergée dans un fantôme liquide avec un niveau d'autofluorescence plus important décrit à la fin de la section 4.1. Pour rappel, la concentration de fluorophore libre dans le fantôme pour simuler l'autofluorescence est cinq fois supérieure à la concentration utilisée dans la section précédente.

Nous avons tout d'abord étudié l'amélioration du contraste apportée par la détection localisée en fonction de la distance entre la bande de détection et la bande d'excitation pour différentes profondeurs d'inclusion. Les résultats sont présentés sur la figure suivante.

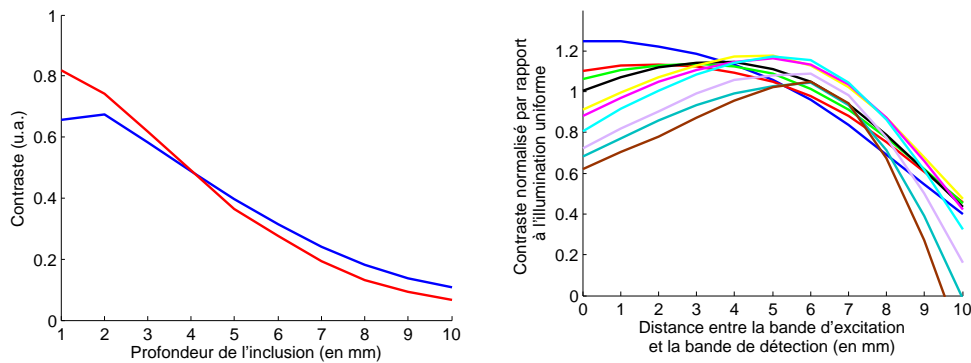


FIGURE 4.13 – **A gauche : Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme (—) et en détection localisée simple sur l'excitation (—); A droite : Evolution du contraste (normalisé par rapport à l'illumination uniforme) en détection localisée simple en fonction de l'écart entre la ligne d'excitation et la ligne de détection : inclusion à 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).**

Contrairement au cas présenté dans la section précédente, on peut constater que la détection localisée n'améliore pas le contraste pour toutes les profondeurs lorsque la bande de détection se situe sur la bande d'excitation : ici, on n'a un contraste supérieur ou égal à celui obtenu en illumination uniforme que pour les 4 premiers millimètres. Toutefois, comme dans le cas précédent, il est possible d'optimiser le résultat en prenant une bande de détection éloignée de l'excitation, et ici aussi on remarque un lien entre la bande de détection optimale et la profondeur de l'inclusion. L'augmentation du contraste est cependant moins importante que dans le cas précédent : pour une inclusion à 1 mm de profondeur, le gain maximum est d'environ 1,2 en faisant la détection directement sur l'excitation, et pour une inclusion à 1 cm il est à peine supérieur à 1 en faisant la détection à 6 mm de l'excitation.

On peut noter que les écarts sources-détecteurs optimaux sont sensiblement différents de ceux observés dans le cas précédent. Contrairement à ce que l'on a vu dans le chapitre 2 en simulation, il semblerait donc que, en plus de la profondeur, le niveau de signal parasite ait aussi une influence sur la distance sources-détecteurs optimale.

Ceci a été vérifié expérimentalement en observant une inclusion à une profondeur donnée de 3 mm et pour quatre niveaux croissants d'autofluorescence. Les résultats sont visibles sur la figure 4.14.

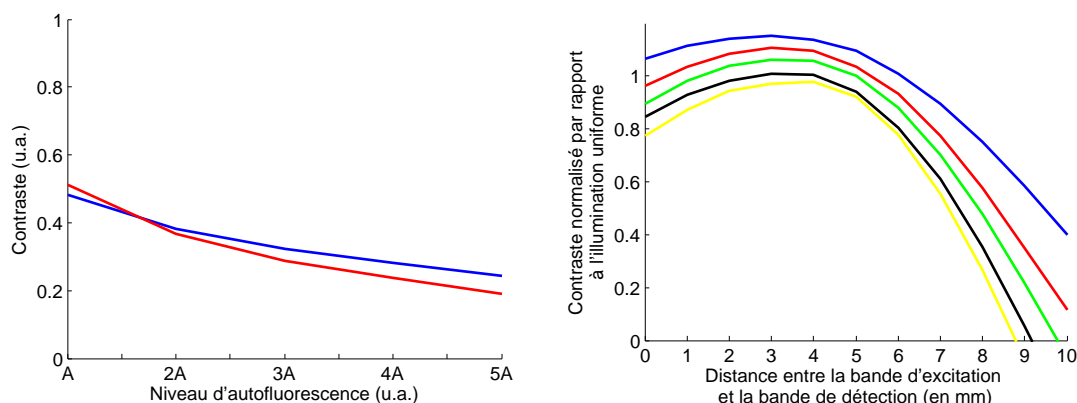


FIGURE 4.14 – **A gauche : Comparaison entre le contraste obtenu avec l'illumination uniforme (—) et le contraste obtenu avec la détection localisée faite sur l'excitation (—) pour 5 niveaux d'autofluorescence ; A droite : Evolution du contraste (normalisé par rapport à l'illumination uniforme) en détection localisée simple en fonction de l'écart entre la ligne d'excitation et la ligne de détection : niveau d'autofluorescence A (—), niveau 2A (—), niveau 3A (—), niveau 4A (—), niveau 5A (—).**

On remarque que le contraste diminue en fonction du niveau d'autofluorescence de manière comparable pour l'illumination uniforme et pour la détection localisée sur l'excitation. Le contraste en détection localisée est cependant inférieur à celui en illumination uniforme à partir du deuxième niveau d'autofluorescence étudié. On remarque comme précédemment que l'écart sources-détecteurs permet d'augmenter le contraste par rapport à la détection confocale quel que soit le niveau d'autofluorescence. Cependant, pour les deux plus hauts niveaux d'autofluorescence, il est impossible d'avoir un contraste supérieur à l'illumination uniforme quel que soit l'écart sources-détecteurs sélectionné.

On retrouve le fait que le niveau d'autofluorescence semble avoir une influence sensible sur la distance sources-détecteurs optimale : pour le niveau d'autofluorescence le plus bas, le gain maximum est obtenu pour une distance sources-détecteurs de 3 mm alors que pour le niveau d'autofluorescence le plus haut la distance optimale est de 4 mm. Cette différence de comportement par rapport aux simulations présentées dans le chapitre 2 pourrait être attribuée à un biais expérimental : les ajouts de fluorophores pourraient avoir modifié les propriétés optiques du fantôme, entraînant ainsi une variation de l'écart sources-détecteurs optimal. Cette variation reste toutefois relativement faible.

Sur la figure 4.15, on a présenté les résultats obtenus avec la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage. Vingt tailles de voisinage ont été considérées pour le calcul du signal à soustraire.

Dans le cas précédent, on avait une augmentation du contraste sur les 4 premiers milli-

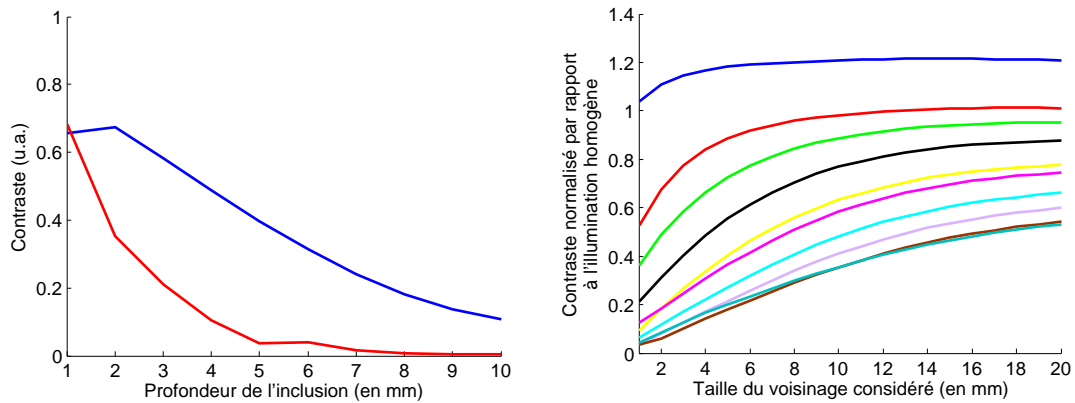


FIGURE 4.15 – **A gauche** : Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme (—) et en détection localisée avec soustraction du voisinage immédiat (—); **A droite** : Evolution du contraste (normalisé par rapport à l'illumination uniforme) en détection localisée avec soustraction du voisinage en fonction de la taille du voisinage : inclusion à 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).

mètres en faisant une détection localisée sur l'excitation avec soustraction du voisinage direct. Dans ce cas, même à 1 mm de profondeur le gain au niveau du contraste est quasi nul. De même, bien que sélectionner des bandes de voisinage plus grandes pour faire le calcul du signal à soustraire entraîne une augmentation du contraste par rapport au voisinage direct, le résultat reste moins bon que ce qu'on aurait avec une illumination uniforme sauf pour la première profondeur de 1 mm où on peut obtenir un gain de 20%.

Les résultats obtenus avec la méthode de modélisation du signal par l'excitation sont présentés sur la figure 4.16. On y compare les contrastes observés aux dix profondeurs avec l'illumination uniforme, la modélisation en utilisant les paramètres locaux (paramètres spécifiques à chaque position d'excitation), et la modélisation en utilisant les paramètres globaux (valeurs moyennes des paramètres sur toutes les positions d'excitation).

Comme dans le cas avec une plus faible autofluorescence, on remarque que la technique de modélisation par l'excitation nous permet d'obtenir un meilleur contraste en comparaison avec l'illumination uniforme. Cependant, comme pour les autres techniques présentées jusqu'à présent dans cette section, le gain observé est inférieur à celui observé dans le cas avec une autofluorescence plus faible et réaliste. Dans le cas de la modélisation avec les paramètres locaux, le gain devient même très faible. La modélisation avec les paramètres globaux reste quant à elle meilleure.

Les résultats obtenus avec notre traitement simulant une illumination structurée dans le cas d'une inclusion unique sont présentés dans la figure suivante.

Dans ce cas, l'illumination structurée n'est utile que pour les 5 premiers millimètres, et le gain en contraste reste relativement anecdotique. On remarque toutefois ici aussi le lien entre

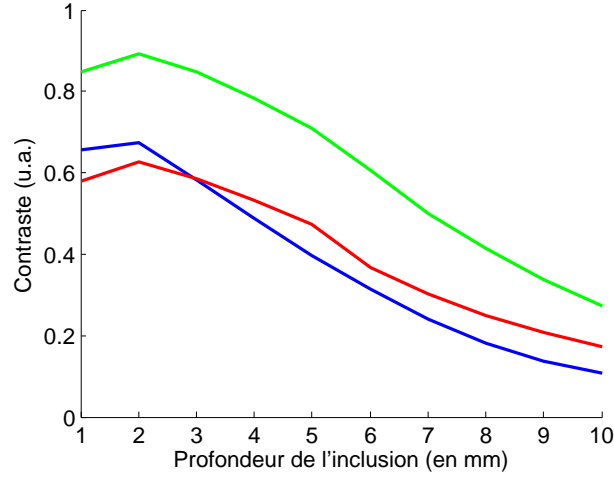


FIGURE 4.16 – Comparaison entre le contraste obtenu : en illumination uniforme (—), avec la modélisation avec les paramètres locaux (—) et avec la modélisation avec les paramètres globaux (—).

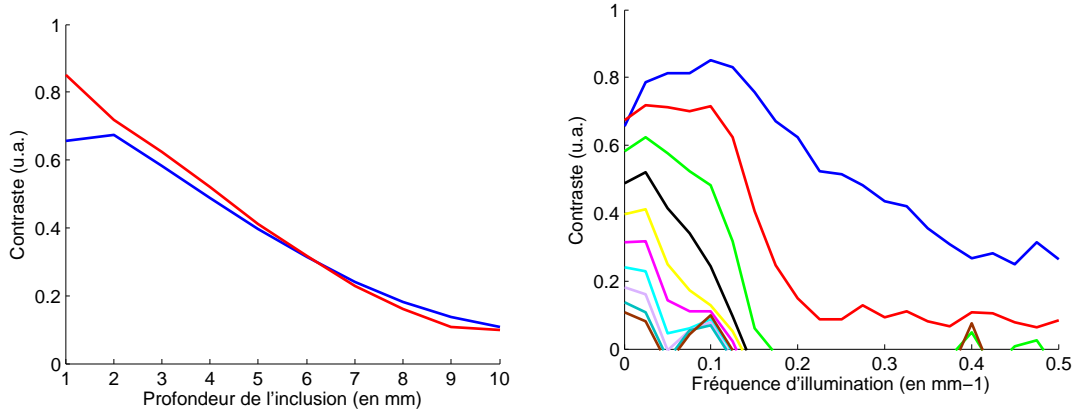


FIGURE 4.17 – A gauche : Comparaison entre le contraste obtenu en illumination uniforme (—) et en illumination structurée à la fréquence optimale (—) ; A droite : Evolution du contraste (normalisé par rapport à l'illumination uniforme) en illumination structurée en fonction de la fréquence spatiale : inclusion à 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).

la fréquence d'illumination et le gain en contraste en fonction de la profondeur de l'inclusion considérée.

La figure 4.18 récapitule les résultats obtenus avec les différentes méthodes présentées dans ce chapitre.

Contrairement au cas avec une faible autofluorescence, les méthodes n'offrent un gain au niveau du contraste que pour les premiers millimètres de profondeurs, et celui-ci reste moins

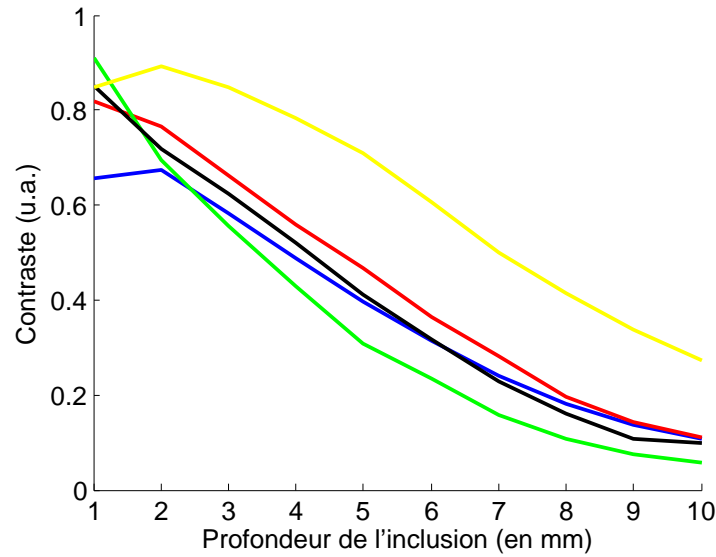


FIGURE 4.18 – Comparaison entre le contraste obtenu avec l’illumination uniforme (—), la détection localisée simple avec une distance de détection optimisée (—), la détection localisée avec soustraction du voisinage optimisée (—), l’illumination structurée avec la fréquence spatiale optimisée (—) et la modélisation par l’excitation avec les paramètres globaux (—).

important que dans le cas précédent.

Seule la méthode de modélisation par l’excitation permet d’obtenir un meilleur contraste qu’en illumination uniforme. Comme on va cependant le voir avec les exemples d’images donnés ci-après, des artéfacts non négligeables sont présents sur les images obtenues avec cette technique dans la mesure où nous n’effectuons qu’un balayage.

De même que pour le cas précédent, nous montrons à titre de comparaison sur les figures 4.19 et 4.20, les images obtenues en illumination uniforme et avec les autres méthodes pour une inclusion à 1 mm et à 10 mm.

Lorsque l’inclusion est à 1 mm, on voit comme précédemment que les améliorations au niveau du contraste sont toutes comparables. On retrouve aussi le fait que la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage semble plus intéressante puisqu’elle permet d’améliorer plus fortement la résolution. Comme dans cette expérience la ligne a été balayée perpendiculairement au capillaire, on observe toutefois une hétérogénéité du signal le long du capillaire.

Lorsque l’inclusion est à 10 mm, on voit cette fois une différence par rapport au cas précédemment étudié. Dans ce cas, la méthode d’illumination structurée est moins intéressante du fait des artéfacts importants qui apparaissent en limitant fortement la zone de validité. La méthode de modélisation par l’excitation offre aussi encore de bonnes performances si l’on choisit les paramètres locaux. Le fait d’utiliser les paramètres globaux cause de trop grands effets de bords dans notre cas où nous ne faisons le balayage que dans un sens.

Les méthodes de détection localisée ne permettent quant à elles plus d'obtenir un meilleur contraste comme dans le cas précédent, même si on observe tout de même une diminution du fond dans la direction du balayage de la ligne. On note aussi que dans ce cas où le signal parasite a une intensité forte, le fait de prendre des bandes de pixels larges de 5 pixels (correspondant au pas de translation de 1 mm avec la résolution de notre système pour ces expériences) entraîne des artefacts en forme de "striures" sur les images obtenues en détection localisée. Les expériences réalisées par la suite ont été faites avec un pas correspondant à une largeur d'un pixel afin d'éviter ce problème.

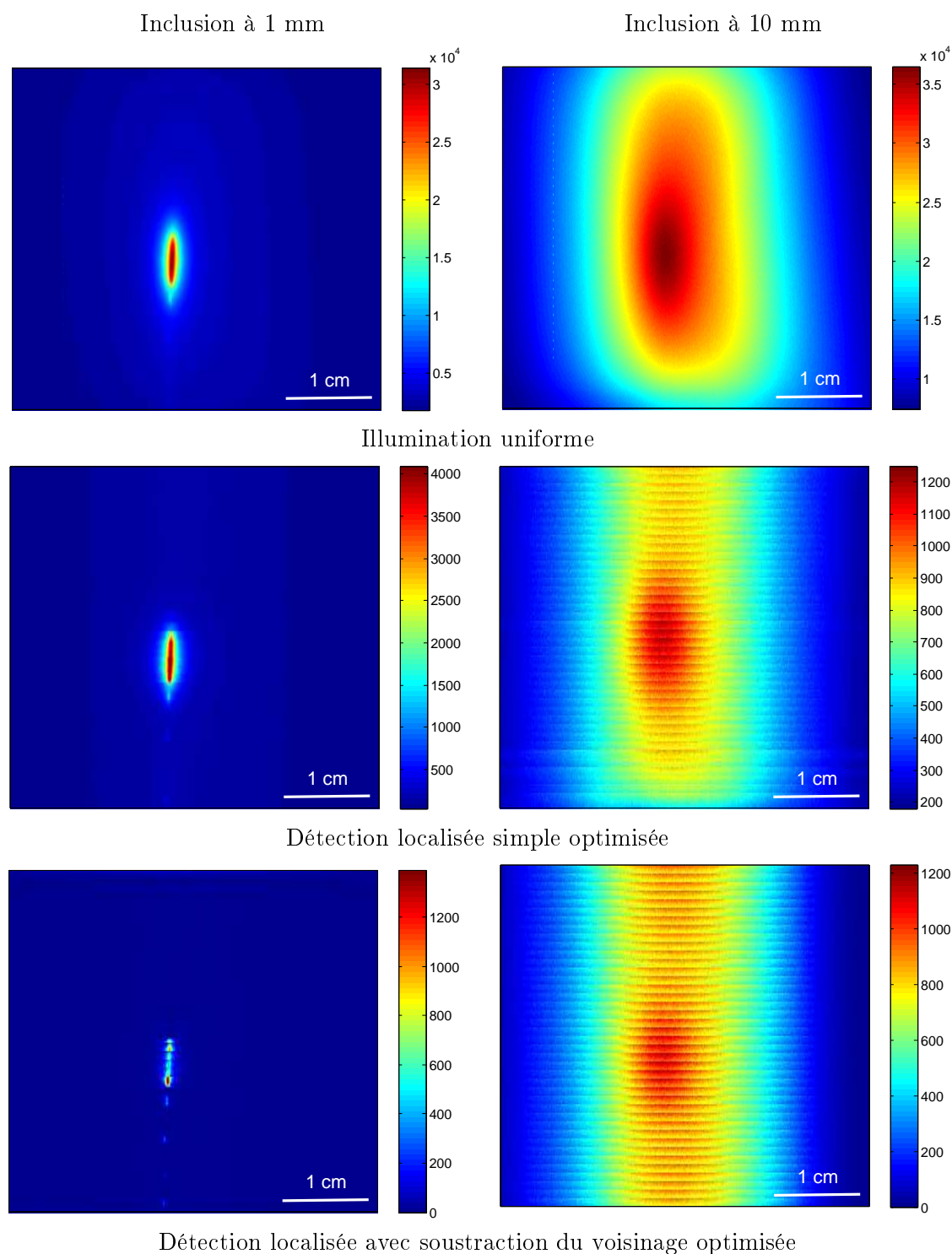


FIGURE 4.19 – Exemples d’images obtenues avec l’illumination uniforme et les méthodes de détection localisée pour une inclusion située à 1 mm (à gauche) et à 10 mm (à droite) de profondeur ; l’échelle de couleur des images est normalisée sur les valeurs minimum et maximum.

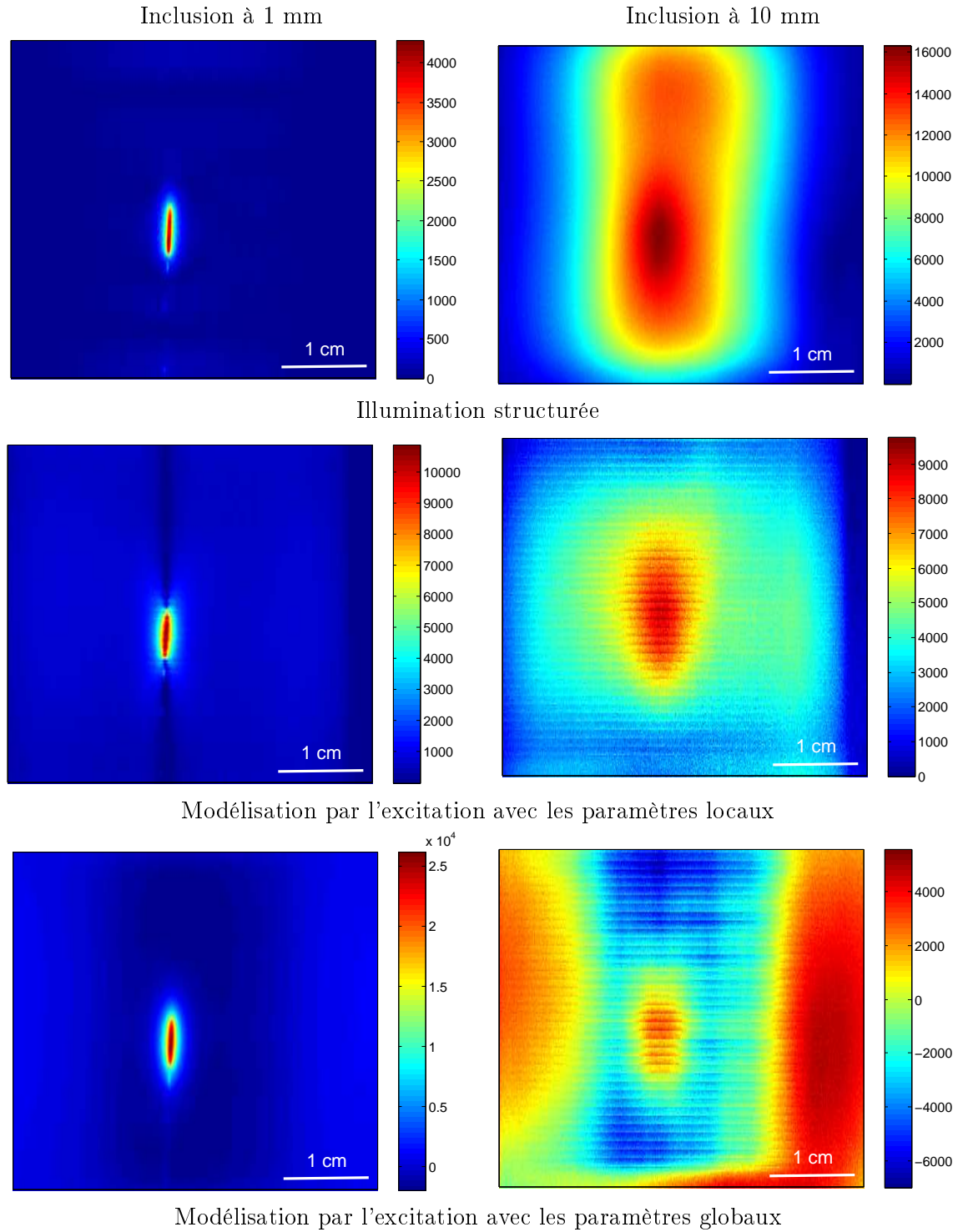


FIGURE 4.20 – Exemples d’images obtenues avec l’illumination structurée et la méthode de modélisation du signal parasite par l’excitation (paramètres locaux et globaux) pour une inclusion située à 1 mm (à gauche) et à 10 mm (à droite) de profondeur ; l’échelle de couleur des images est normalisée sur les valeurs minimum et maximum.

4.3 Amélioration de la résolution spatiale : étude sur fantômes complexes

4.3.1 Difficultés rencontrées en illumination uniforme

En plus de l'amélioration de contraste observée par rapport à l'illumination uniforme, les méthodes présentées dans ce document permettent aussi d'avoir une meilleure résolution. Elles offrent alors un intérêt dans les cas plus complexes où plusieurs objets fluorescents sont observés en même temps.

Pour comprendre la nécessité d'améliorer la résolution, on peut par exemple se placer dans la configuration où l'on observe quatre capillaires ayant la même concentration de fluorophore mais positionnés à différentes profondeurs en illumination uniforme. On obtient l'images suivante.

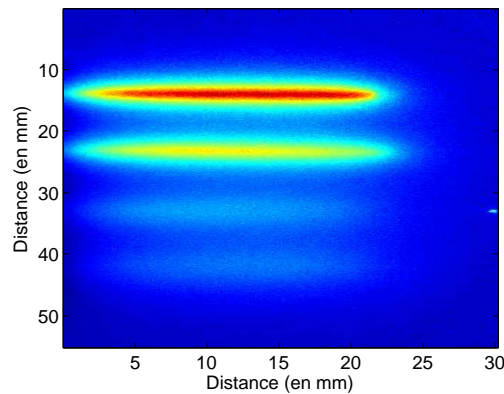


FIGURE 4.21 – Image obtenue en illumination uniforme d'un fantôme possédant des propriétés optiques proches de celles des tissus vivants ($\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_a = 0,5 \text{ cm}^{-1}$) dans lequel on a immergé quatre capillaires à des profondeurs croissantes du haut vers le bas.

On voit sur cette image que le fait d'avoir une illumination uniforme nous gêne pour la localisation des capillaires les plus profonds, leur fluorescence paraissant amoindrie par rapport à celle des capillaires les plus proches de la surface en raison de la diffusion des photons au sein du milieu.

Ce problème va être d'autant plus important dans les cas où l'autofluorescence sera plus forte, cette dernière gênant la capacité de détection pour les capillaires les plus enfouis du fait de leur signal inférieur à celui de l'autofluorescence.

4.3.2 Fantômes avec une faible autofluorescence

4.3.2.1 Amélioration de la résolution avec le fantôme à deux capillaires

Pour étudier l'amélioration apportée par nos méthodes par rapport à l'illumination uniforme dont les limites ont été évoquées dans la section précédente, nous avons tout d'abord effectué une étude poussée sur le fantôme liquide à deux capillaires décrit dans le chapitre 3 pour des capillaires compris entre 1 et 10 mm pour un niveau d'autofluorescence réaliste et relativement faible évoqué dans la section 4.1. Pour rappel, le ratio des concentrations entre l'inclusion fluorescente et le fond est de 80.

La figure suivante montre les résultats obtenus en illumination uniforme lors de l'observation du fantôme avec deux capillaires proches.

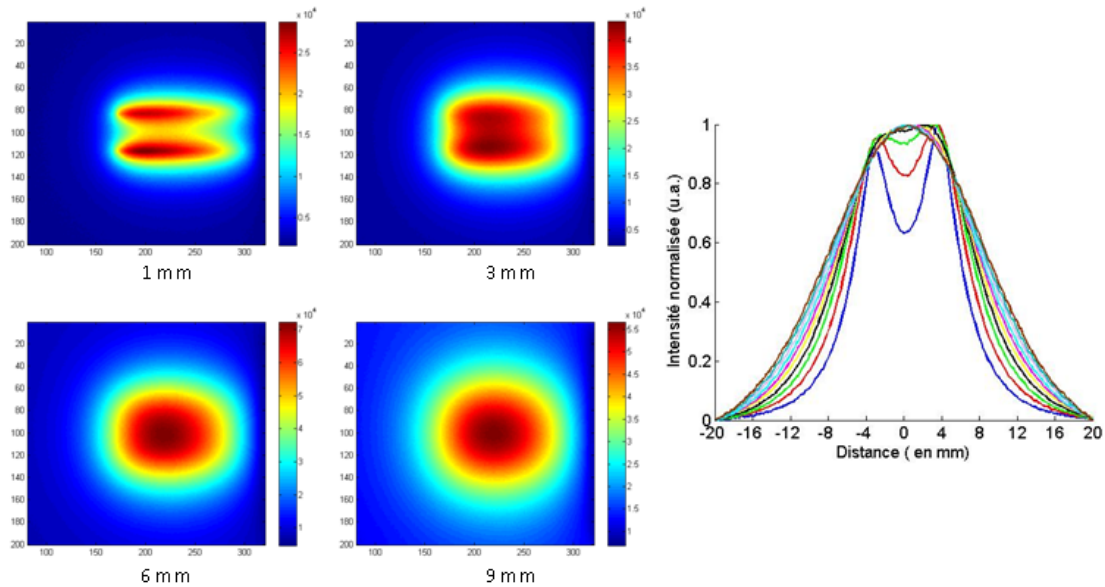


FIGURE 4.22 – **A gauche : Images obtenues en illumination uniforme pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).**

On voit tout d'abord l'influence de la profondeur sur la capacité de séparation des capillaires : on voit qu'à partir de 3 mm on ne peut plus distinguer les deux capillaires, le signal de fluorescence étant alors comparable à une inclusion unique plus large.

On voit aussi que même pour une profondeur de 1 mm le rapport entre le pic d'intensité des capillaires et le creux entre eux n'est que de 35 % environ.

La figure 4.23 présente le même cas de figure en utilisant la méthode de détection localisée simple avec détection sur l'excitation. On voit que cette méthode améliore la résolution puisqu'on est capable de distinguer les capillaires jusqu'à une profondeur de 4 mm. Avec cette méthode, pour une profondeur de 1 mm, le rapport entre le pic d'intensité des capillaires et

le creux entre eux est de 70 % environ.

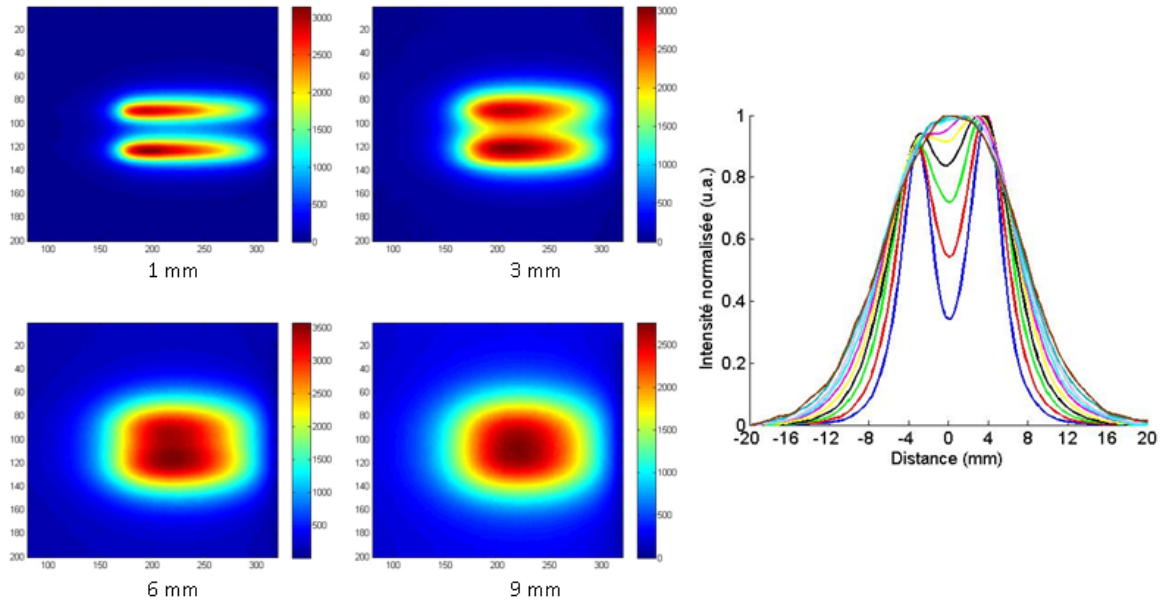


FIGURE 4.23 – A gauche : Images obtenues en détection localisée simple pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).

On a ensuite appliqué la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage. Comme on peut le voir sur la figure 4.24, la séparation des capillaires est fortement améliorée par rapport à l'illumination uniforme, permettant la séparation des capillaires jusqu'à 6 mm. On obtient cette fois-ci un très bon rapport de 95 % environ entre le pic d'intensité des capillaires et le creux entre eux.

Enfin, on a appliqué notre technique d'illumination structurée, les résultats obtenus étant présentés sur la figure 4.25.

Comme on peut le voir, la séparation est excellente jusqu'à une profondeur de 6 mm. Elle reste bonne pour les profondeurs jusqu'à 1 cm (le rapport entre le pic d'intensité des capillaires et le creux entre eux est alors de 40% environ), mais les artéfacts présents sur les bords de la zone de validité sont de plus en plus importants et viennent perturber la mesure. A une profondeur de 1 mm, le rapport entre le pic d'intensité des capillaires et le creux entre eux est de 95% environ.

Il faut toutefois noter que la fréquence optimale à utiliser pour séparer les deux capillaires est la même, quelle que soit la profondeur des capillaires considérée dans nos expériences, alors qu'on s'attendait à ce qu'elle dépende de leur profondeur. Nous observons tout de même une disparition du signal de fluorescence des deux capillaires qui dépend de la fréquence spatiale utilisée en fonction de leur profondeur.

Pour résumer les résultats présentés dans cette section, on peut constater que chacune des

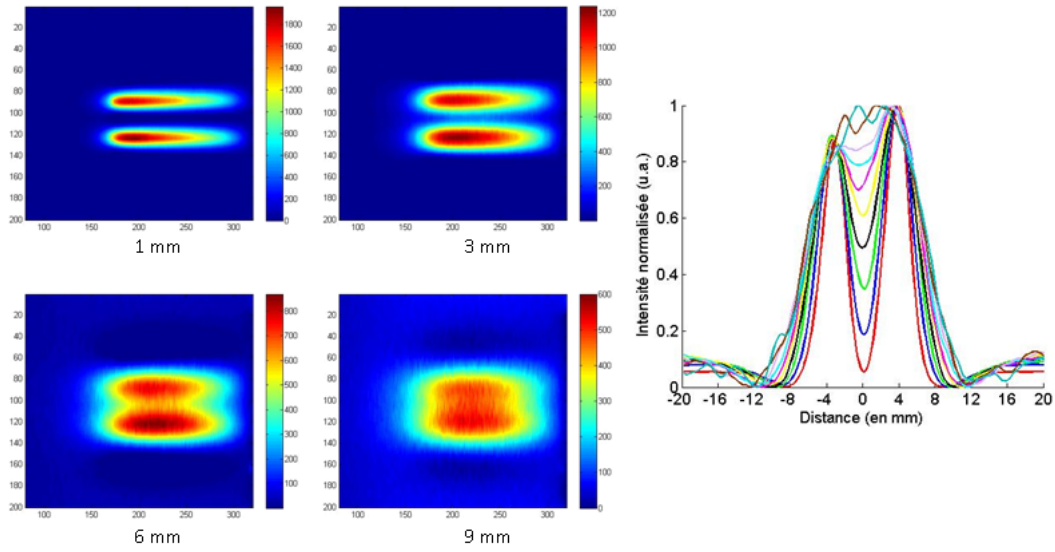


FIGURE 4.24 – A gauche : Images obtenues en détection localisée avec soustraction du voisinage pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).

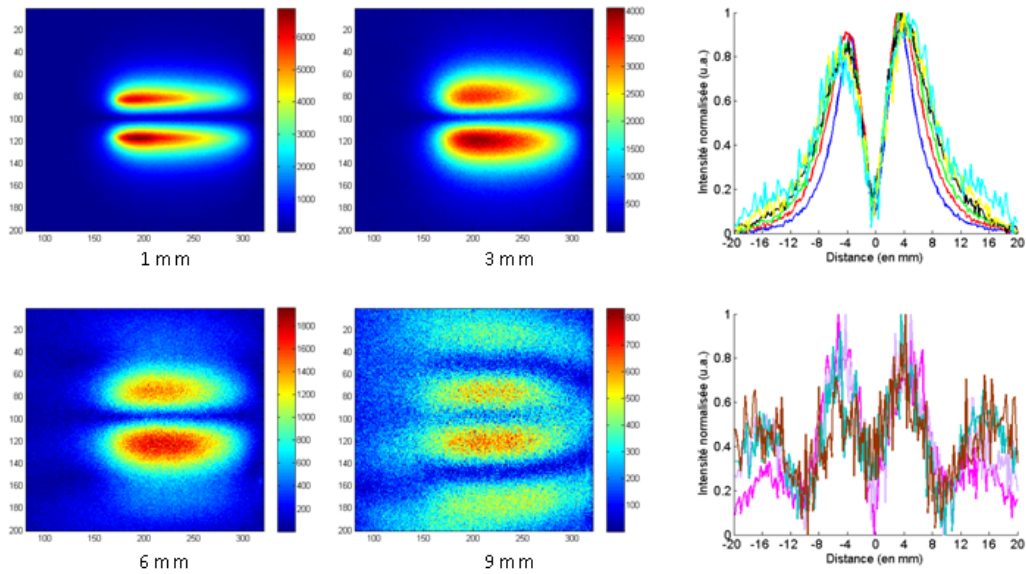


FIGURE 4.25 – A gauche : Images obtenues en illumination structurée pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—), 9mm (—), 10mm (—).

techniques présentées offre une amélioration substantielle en termes de résolution par rapport à l'illumination uniforme.

La technique offrant les meilleures performances est l'illumination structurée, mais elle entraîne des artéfacts qui deviennent non négligeable lorsqu'on considère des capillaires enfouis trop profondément. Les techniques de détection localisée améliorent quant à elle la résolution dans une moindre mesure mais offrent l'avantage d'être beaucoup plus simple à implémenter.

Il faut aussi noter que pour obtenir les résultats présentés dans cette section nous avons réalisé un balayage de la ligne parallèle aux capillaires. Avec un balayage perpendiculaire, nous aurions tout de même pu observer une amélioration au niveau de la résolution mais celle-ci aurait été beaucoup plus faible. Nous allons voir dans la section suivante l'influence du sens du balayage en utilisant la mire de fluorescence.

4.3.2.2 Influence du sens de balayage avec la mire de fluorescence

Pour illustrer l'influence du sens du balayage, nous avons effectué une étude avec la mire de fluorescence décrite dans le chapitre 3. Pour cette expérience, le ratio des concentrations entre l'inclusion fluorescente et le fond est toujours de 80.

Sur la figure 4.26, on peut voir les images obtenues en détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage, et illumination structurée pour deux sens de balayage perpendiculaires. On a aussi représenté la somme des deux sens de balayage. Pour cet exemple, la mire de fluorescence est située à 1 mm de profondeur.

On voit clairement sur cette figure l'influence du sens du balayage sur l'amélioration de la résolution. En effet, que ce soit pour les méthodes de détection localisée ou bien pour la méthode d'illumination structurée, la résolution est principalement améliorée dans la direction parallèle à la direction du balayage (indiquée par une flèche sur la figure). Les images acquises en illumination uniforme (non représentées ici) sont, comme attendu, les mêmes pour les deux directions de balayage.

On a représenté sur la dernière colonne de cette figure les images obtenues pour ces trois méthodes lorsqu'on somme les images pour les deux balayages. On constate alors qu'on obtient une image ayant une résolution améliorée dans les deux sens.

On remarque aussi sur la deuxième ligne de cette figure que certains artéfacts peuvent apparaître en détection localisée avec soustraction du voisinage. Ces artéfacts peuvent être visibles lorsque la taille du voisinage considéré est trop petite par rapport à la taille optimale pour la profondeur considérée. On notera toutefois que la somme des deux sens de balayage compense ces artéfacts, ils ne sont donc jamais problématiques en pratique.

4.3.2.3 Amélioration de la résolution avec la mire de fluorescence

Pour les résultats que nous allons présenter, la somme de deux sens de balayage perpendiculaires a été utilisée.

Sur la figure 4.27, on a représenté les images obtenues en illumination uniforme, en détec-

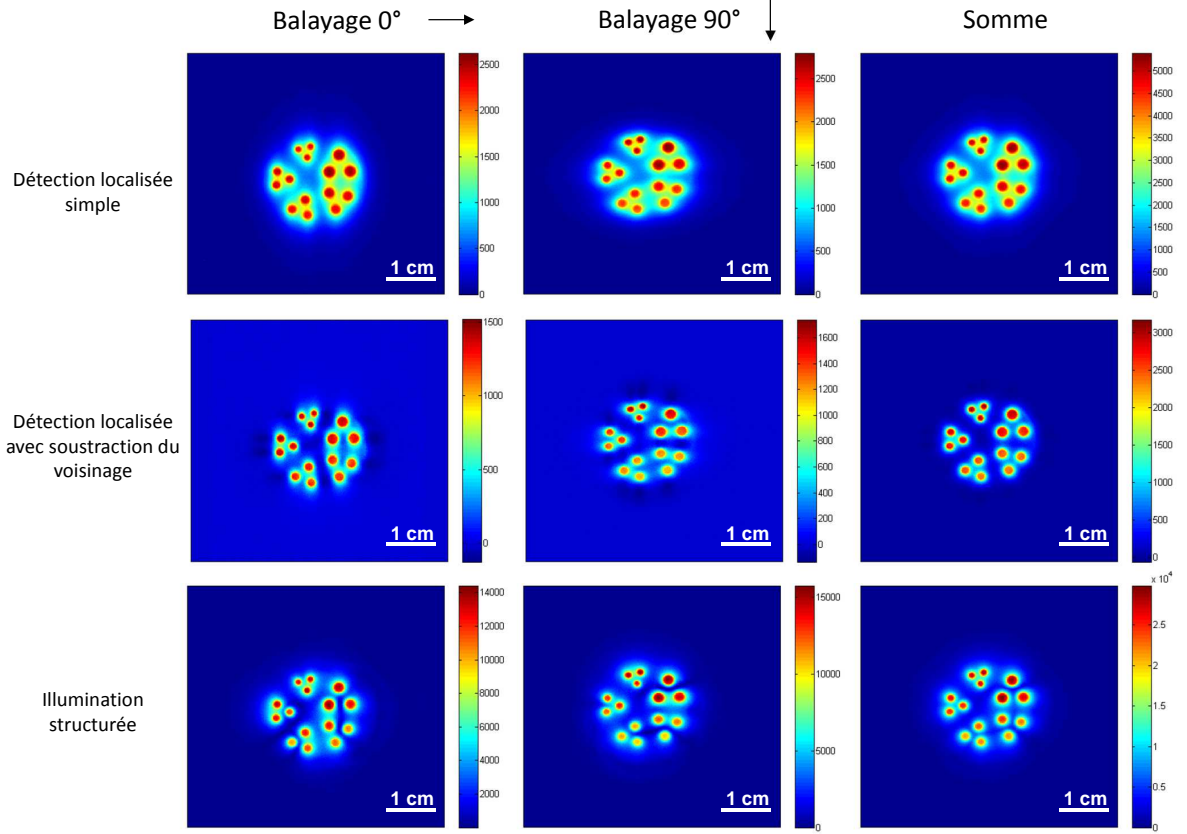


FIGURE 4.26 – Images de la mire de fluorescence à 1 mm de profondeur obtenues en détection localisée simple (ligne du haut), en détection localisée avec soustraction du voisinage (ligne du milieu) et en illumination structurée (ligne du bas) pour deux sens de balayages perpendiculaires (0° colonne de gauche et 90° colonne du milieu) et la somme de ces deux sens (colonne de droite).

tion localisée simple et avec soustraction du voisinage, et en illumination structurée, lorsque la mire de résolution fluorescente est immergée dans un fantôme liquide à quatre profondeurs différentes comprises entre 1 et 4 mm. On étudie alors l'amélioration de la détection en profondeur associée à l'amélioration de la résolution apportée par nos méthodes. Pour cette expérience, nous avons utilisé des paramètres de base pour les méthodes de détection localisée (détection sur l'excitation en détection localisée simple, et taille de voisinage de 1 mm pour la détection localisée avec soustraction du voisinage). Nous nous plaçons alors dans un cas réaliste où aucune information sur la profondeur ne serait disponible *a priori*. Pour l'illumination structurée, la fréquence spatiale optimale a été choisie après traitement parmi les dix fréquences considérées comprises entre $0,025$ et $0,25 \text{ mm}^{-1}$.

En illumination uniforme (première colonne), on ne distingue correctement la mire qu'à la profondeur de 1 mm. Il y a déjà une superposition des signaux entre les différents groupes d'inclusions qui entraîne une surestimation du signal produit par les inclusions les plus larges. À 2 mm, on ne distingue plus les cinq groupes d'inclusions, les signaux provenant des trois groupes d'inclusions les plus larges se recouvrent pour ne former qu'un unique signal de fluo-

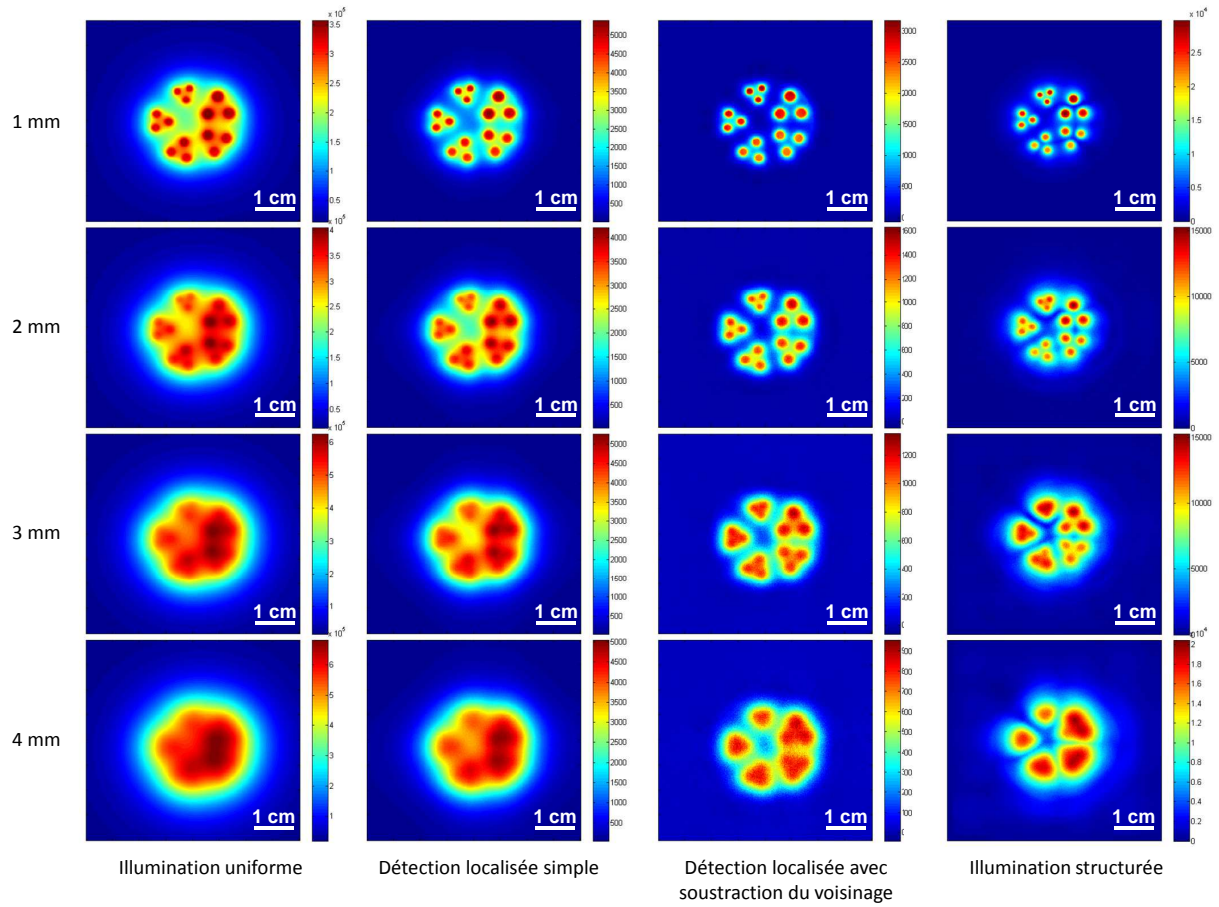


FIGURE 4.27 – Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm obtenues en illumination uniforme (première colonne), détection localisée simple (deuxième colonne), détection localisée avec soustraction du voisinage (troisième colonne) et illumination structurée (quatrième colonne).

rescence plus large. À 3 mm, la mire entière n’émet plus qu’un unique signal de fluorescence et on ne peut plus résoudre les différents groupes d’inclusions fluorescentes. À 4 mm, le signal unique de fluorescence devient encore plus uniforme, il est impossible de distinguer la forme réelle de la mire.

En détection localisée simple (deuxième colonne), les résultats sont sensiblement meilleurs. Cette méthode améliore la résolution car elle augmente le ratio entre le niveau des pics des inclusions fluorescentes et le fond, mais il reste tout de même une contribution du signal de fond dû à la diffusion. À 1 mm, les inclusions individuelles sont visibles pour chacun des groupes. À 2 mm, on distingue chacun des groupes d’inclusions mais il n’est plus possible de séparer clairement les inclusions individuelles à l’intérieur des groupes. À 3 mm, la méthode commence à atteindre ses limites. On ne peut distinguer que les deux groupes d’inclusions les plus petites, les signaux des trois groupes les plus larges se recouvrant. À 4 mm, il devient impossible de distinguer les différents groupes d’inclusions, leurs contributions s’additionnant à cause de la diffusion pour ne former qu’un unique signal de fluorescence large comme on

pouvait l'avoir en illumination uniforme à 3 mm.

La détection localisée avec soustraction du voisinage (troisième colonne) offrent également de très bonnes performances, le signal de fond est correctement supprimé de manière à augmenter le ratio entre le niveau des pics des inclusions fluorescentes et le fond. À 1 mm, on distingue très nettement chacune des inclusions individuelles dans tous les groupes. À 2 mm, la résolution est bonne, le niveau de fond augmente mais on distingue encore chacune des inclusions pour tous les groupes. À 3 mm, la méthode permet encore de séparer clairement les groupes d'inclusions, et il est même possible de distinguer les trois inclusions dans les deux groupes les plus larges. À 4 mm, même s'il n'est plus possible de séparer les inclusions individuelles, on détecte encore cinq groupes d'inclusions distincts.

Enfin, l'illumination structurée (quatrième colonne) offre des résultats très similaires à la détection localisée avec soustraction du voisinage, la séparation entre les différents groupes étant sensiblement meilleure pour les profondeurs à 3 et 4 mm. Ceci s'explique par le fait que, comme nous l'avons mentionné précédemment, la fréquence spatiale optimale a été sélectionné *a posteriori*, contrairement à la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage où la taille du voisinage a été choisie au préalable et n'a donc pas été optimisée.

On notera toutefois une légère distorsion de la mire avec cette méthode pour les profondeurs à 3 et 4 mm : le signal en bordure de la mire semble plus important que le signal en son centre. Ceci pourrait être dû aux effets de bord : même si ces derniers n'entraînent pas dans ce cas une forte hausse du signal en périphérie de la mire comme on pourra le voir dans le cas avec une forte autofluorescence, ils pourraient tout de même être à l'origine de cette augmentation plus forte du signal en bordure de la mire.

Sur la figure 4.28, on a tracé les profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes d'inclusions de la mire (les lignes le long desquelles les profils ont été pris sont indiquées sur l'image en haut de la figure). On compare les profils obtenus avec les quatre méthodes présentées sur la figure 4.27 pour les quatre profondeurs considérées. Sur ces profils, on peut voir de manière plus détaillée ce que l'on a constaté sur la figure 4.27. En effet, on retrouve le fait que la détection localisée simple améliore de manière générale la résolution par rapport à l'illumination uniforme, et que le gain est encore plus important en détection localisée avec soustraction du voisinage ou en illumination structurée. Les performances obtenues avec ces deux dernières méthodes sont comparables, avec un léger avantage pour l'illumination structurée. Cependant, comme nous l'avons précisé, les images en illumination structurée ont été optimisées pour chacun des cas, contrairement aux images en détection localisée avec soustraction du voisinage. Pour donner quelques exemples quantitatifs d'amélioration, à 1 mm, le rapport entre le pic d'intensité des inclusions du groupe 1 et le creux entre eux est de 40 % environ en illumination uniforme, de 65% en détection localisée simple, de 85 % en détection localisée avec soustraction du voisinage et de 90 % en illumination structurée. Pour les inclusions du groupe 5 à 1 mm, le rapport est de 45 % environ en illumination uniforme, de 55% en détection localisée simple, de 70 % en détection localisée avec soustraction du voisinage et de 65 % en illumination structurée.

On voit aussi clairement sur ces profils qu'il est quasiment impossible de séparer les inclusions au sein des groupes à partir d'une profondeur de 3 mm. On ne peut distinguer deux pics

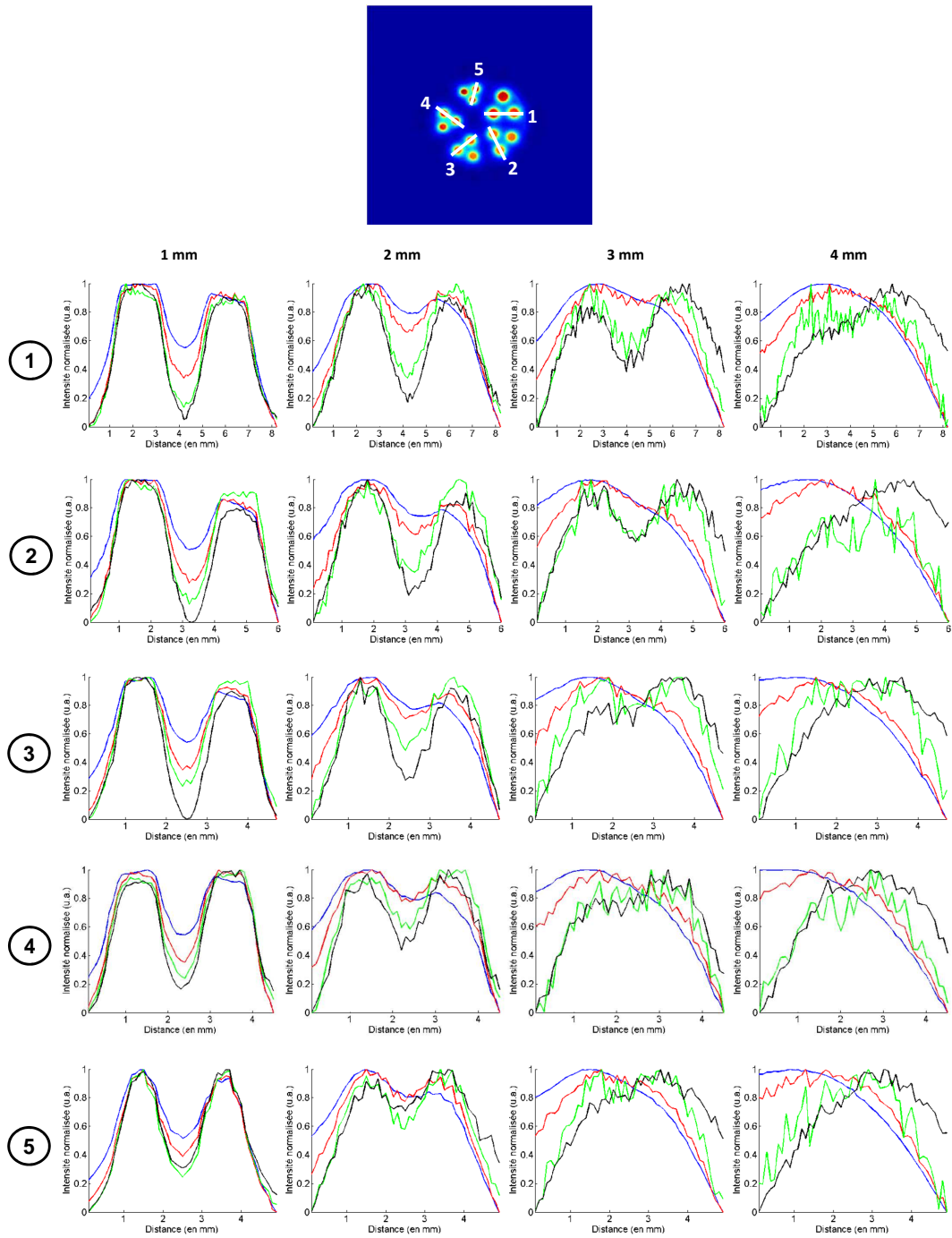


FIGURE 4.28 – Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes (tels que décrit dans l'image) à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm : illumination uniforme (—), détection localisée simple (—), détection localisée avec soustraction du voisinage (—) et illumination structurée (—).

d'intensité que pour les groupes d'inclusions 1 et 2 avec les méthodes de détection localisée avec soustraction du voisinage et d'illumination structurée. Le rapport entre le pic d'intensité des inclusions et le creux entre eux est alors d'environ 55 % pour le groupe 1 et 40 % pour le groupe 2.

Pour résumer ces résultats sur l'amélioration de la résolution, les deux méthodes offrant les meilleures performances sont donc la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage ainsi que la méthode d'illumination structurée. La méthode de détection localisée simple permet aussi d'améliorer la résolution par rapport à l'illumination uniforme, même si cette amélioration est moins importante. Comme nous l'avons fait remarquer pour les résultats sur le contraste, son avantage est son implémentation qui serait beaucoup plus simple.

Nous n'avons pas mentionné la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation pour ces résultats avec la mire de fluorescence car elle ne présente que peu d'intérêt au niveau de la résolution lorsqu'on est en présence d'un niveau de fluorescence parasite faible. Nous en parlerons toutefois dans la prochaine section où nous avons étudié des fantômes avec une autofluorescence plus forte.

4.3.2.4 Compromis avec les méthodes de détection localisée : étude sur le fantôme à quatre capillaires

Nous allons montrer dans cette section le compromis qu'il est nécessaire de faire avec les méthodes de détection localisée. En effet, nous avons vu dans les sections précédentes que ces méthodes permettaient d'améliorer la résolution par rapport à l'illumination uniforme même sans utiliser de paramètres optimisés. Cependant, dans un cas où l'on va observer plusieurs objets fluorescents à des profondeurs différentes, l'amélioration observée va être différente pour chacun des objets.

Cette série de résultats a été obtenue avec le fantôme à quatre capillaires à quatre profondeurs croissantes décrit dans la figure 3.6.c. Comme pour les expériences précédentes, la concentration de fluorescence de fond a été définie de manière à avoir un ratio réaliste entre la fluorescence d'intérêt et l'autofluorescence.

Ces résultats ont été obtenus avec un seul balayage parallèle aux capillaires. Comme nous l'avons vu précédemment, le sens de balayage a une influence sur l'amélioration de la résolution, et ceci est d'autant plus important dans ce cas où nous utilisons des capillaires cylindriques comme inclusions.

Sur les figures 4.29.a, 4.29.b et 4.29.c, on a représenté respectivement les images obtenues en illumination uniforme, avec la détection localisée simple, et avec la détection localisée avec soustraction du voisinage. Ces images montrent à quel point les méthodes de détection localisée permettent d'améliorer la résolution : en illumination uniforme, les quatre inclusions peuvent être détectées mais la résolution latérale est faible à cause de la diffusion des photons autour des inclusions. Le signal de fluorescence des inclusions les plus proches de la surface est diffusé et s'ajoute au signal des inclusions les plus profondes, empêchant toute interprétation des résultats. Avec la détection localisée simple, la résolution est améliorée, le niveau de fond entre

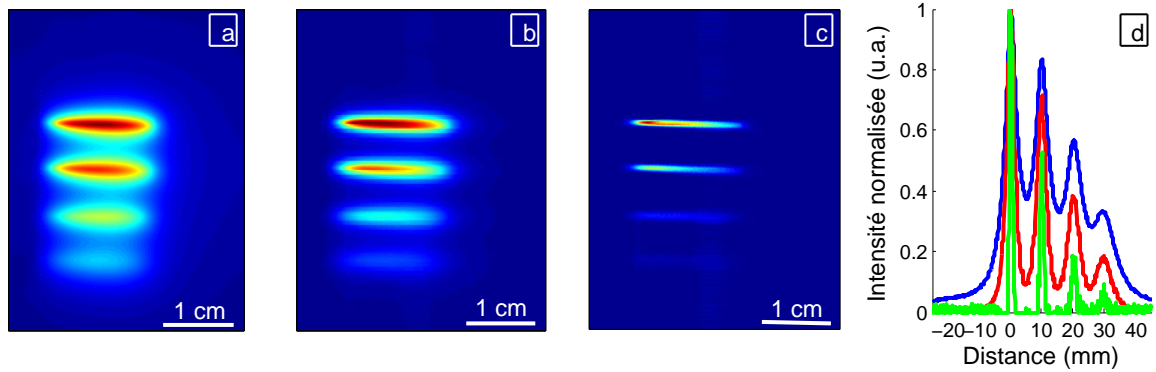


FIGURE 4.29 – Images du fantôme à quatre capillaires ayant la même concentration de fluorophore à quatre profondeurs croissantes (de bas en haut sur les images) obtenues en illumination uniforme (a), détection localisée simple (b) et détection localisée avec soustraction du voisinage (c); (d) : profils d'intensité normalisés pour les trois méthodes pris perpendiculairement aux quatre capillaires en leurs centres.

les capillaires est moins important. Comme nous l'avions vu avec la mire de fluorescence, la meilleure résolution est obtenue avec la détection localisée avec soustraction du voisinage : les deux capillaires les plus proches de la surface sont parfaitement résolus.

Comme on observe en même temps plusieurs objets à des profondeurs différentes, on peut remarquer le compromis que l'on est obligé de faire avec ces méthodes de détection localisée. Pour cette expérience, les paramètres utilisés étaient optimisés pour les capillaires les plus proches de la surface (détection sur l'excitation pour la détection localisée simple, et taille de voisinage de 1 mm pour la détection localisée avec soustraction du voisinage). Cela entraîne donc une perte de signal importante pour les capillaires les plus profonds pour lesquels les paramètres ne sont pas optimisés.

Ceci est aussi visible sur la figure 4.29.d où l'on a représenté les profils d'intensité pris perpendiculairement aux quatre capillaires en illumination uniforme, détection localisée simple et détection localisée avec soustraction du voisinage. On remarque bien l'amélioration de la résolution mais on voit aussi très bien le niveau de signal qui décroît fortement pour les deux capillaires les plus profonds, notamment avec la détection localisée avec soustraction du voisinage.

4.3.2.5 Intérêt de l'amélioration de la résolution dans un cas pratique : l'“effet d'écran”

Nous allons présenter dans cette section une amélioration de la détection sous-jacente à l'amélioration de la résolution qui permet à nos méthodes de réduire l'“effet d'écran”. Ce terme désigne un problème auquel on peut être confronté dans des cas réels d'imagerie de fluorescence : il peut arriver qu'une zone marquée émette un signal de fluorescence faible et soit cachée par la diffusion d'un signal de fluorescence plus fort d'une autre zone marquée

proche. Dans ce cas, les systèmes fonctionnant avec une illumination uniforme sont dans l'incapacité de détecter la zone fluorescente ayant le signal le plus faible car les deux zones sont excitées de manière équivalente.

Nous avons étudié l'intérêt de nos méthodes pour contourner ce problème avec les deux fantômes décrits sur la figure 3.6.d du chapitre 3.

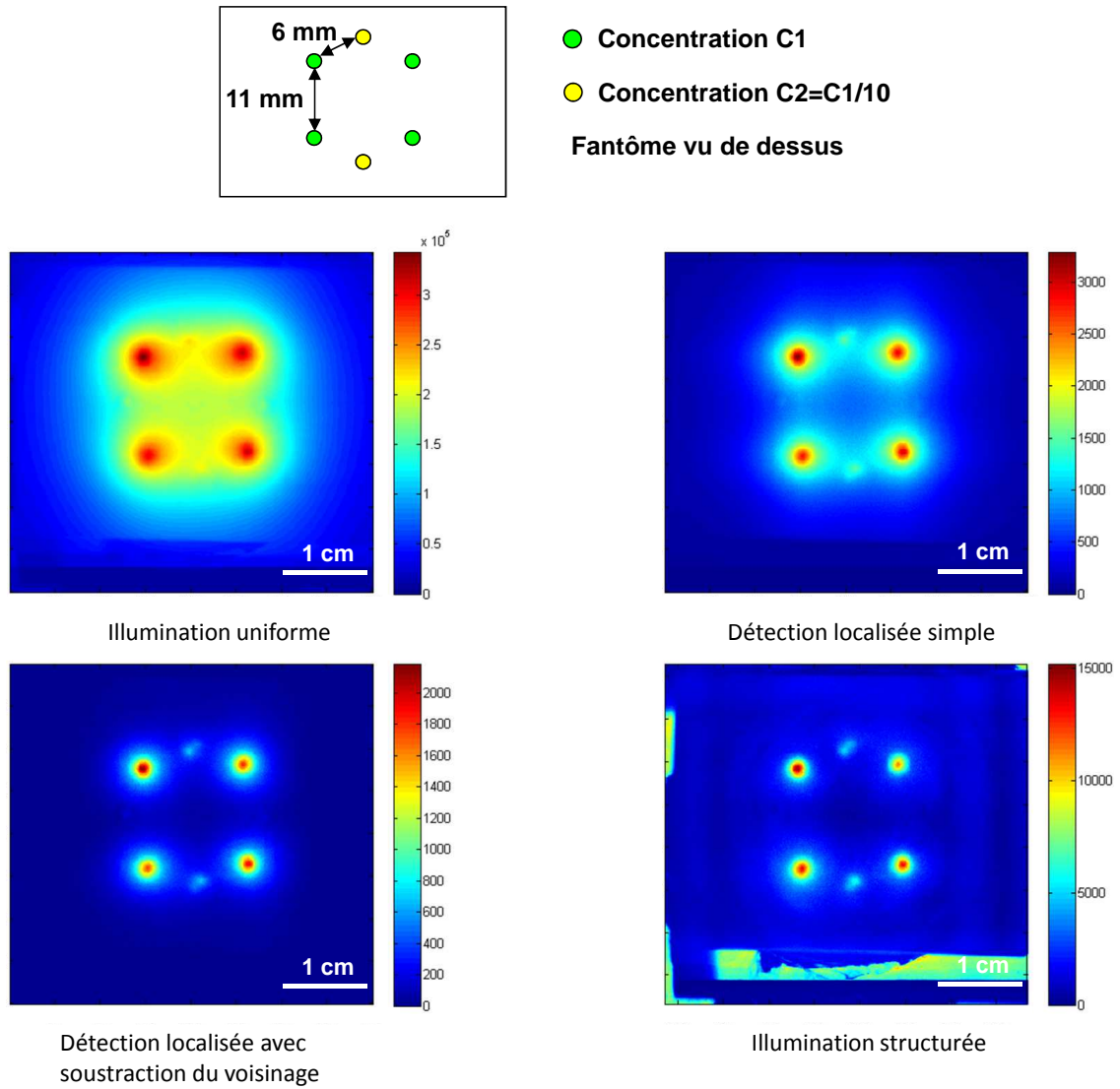


FIGURE 4.30 – Description du fantôme étudié avec deux concentrations et images obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée.

On voit, sur la figure 4.30, les résultats obtenus avec le premier de ces deux fantômes (la configuration des inclusions fluorescentes est rappelée en haut de la figure). Dans ce cas, on considère deux concentrations différentes, une concentration $C1$ de $10 \mu\text{M}$ et une concentration $C2$ dix fois plus faible. Les inclusions sont à 2 mm de profondeur. Les paramètres utilisés avec la

détection localisée sont les paramètres basiques (détection sur l'excitation en détection localisée simple et taille de voisinage de 1 mm en détection localisée avec soustraction du voisinage), la fréquence optimale a été choisie en illumination structurée et elle est de $0,15 \text{ mm}^{-1}$.

Sur l'image obtenue en illumination uniforme, on voit que l'on détecte les quatre inclusions à la concentration $C1$, mais, à cause de la diffusion, il est impossible de distinguer les deux inclusions à la concentration $C2$. Avec la détection localisée simple, on remarque qu'il est possible de distinguer les deux inclusions à la concentration $C2$, même si la diffusion empêche encore d'avoir une séparation nette avec les inclusions à la concentration $C1$. La détection localisée avec soustraction du voisinage offre les meilleures performances : on a une séparation nette entre les deux types d'inclusion, et on ne détecte aucun signal de fond. Enfin, l'illumination structurée permet d'avoir une séparation entre les inclusions comparables à celle observée en détection localisée avec soustraction du voisinage, mais on constate qu'il subsiste des artéfacts dus au niveau de fluorescence de fond. Le niveau de fluorescence important observé en bas de l'image est dû au bord du fantôme.

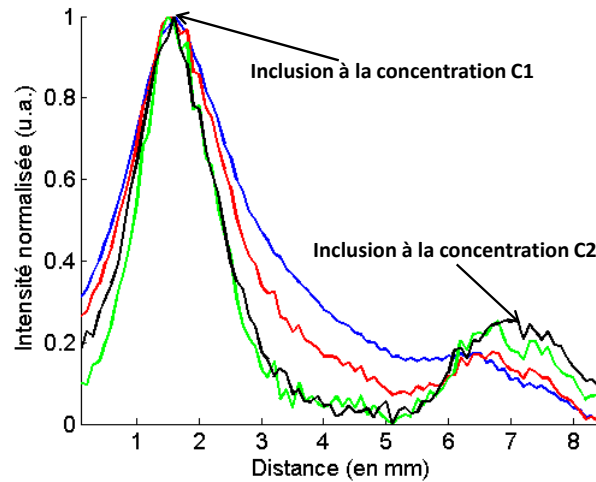


FIGURE 4.31 – Profils d'intensité normalisés pour les images en illumination uniforme (—), détection localisée simple (—), détection localisée avec soustraction du voisinage (—) et illumination structurée (—) ; le profil étudié est pris le long de deux inclusions aux concentrations $C1$ et $C2$.

Sur la figure 4.31, on a tracé les profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions aux concentrations $C1$ et $C2$ obtenus avec les quatre méthodes présentées sur la figure 4.30.

On retrouve les constatations faites précédemment, à savoir qu'il est impossible de détecter l'inclusion à la concentration $C2$ en illumination uniforme à cause de la diffusion du signal de fluorescence de l'inclusion à la concentration $C1$. La détection localisée simple permet de distinguer l'inclusion à la concentration $C2$, mais les meilleures performances sont obtenues avec la détection localisée avec soustraction du voisinage et avec l'illumination structurée.

On notera toutefois sur ces profils qu'il est difficile d'être quantitatif : la concentration de fluorophore est dix fois plus faible dans l'inclusion à la concentration $C2$, mais le niveau du pic d'intensité est quant à lui cinq fois plus faible avec les méthodes offrant la meilleure

résolution.

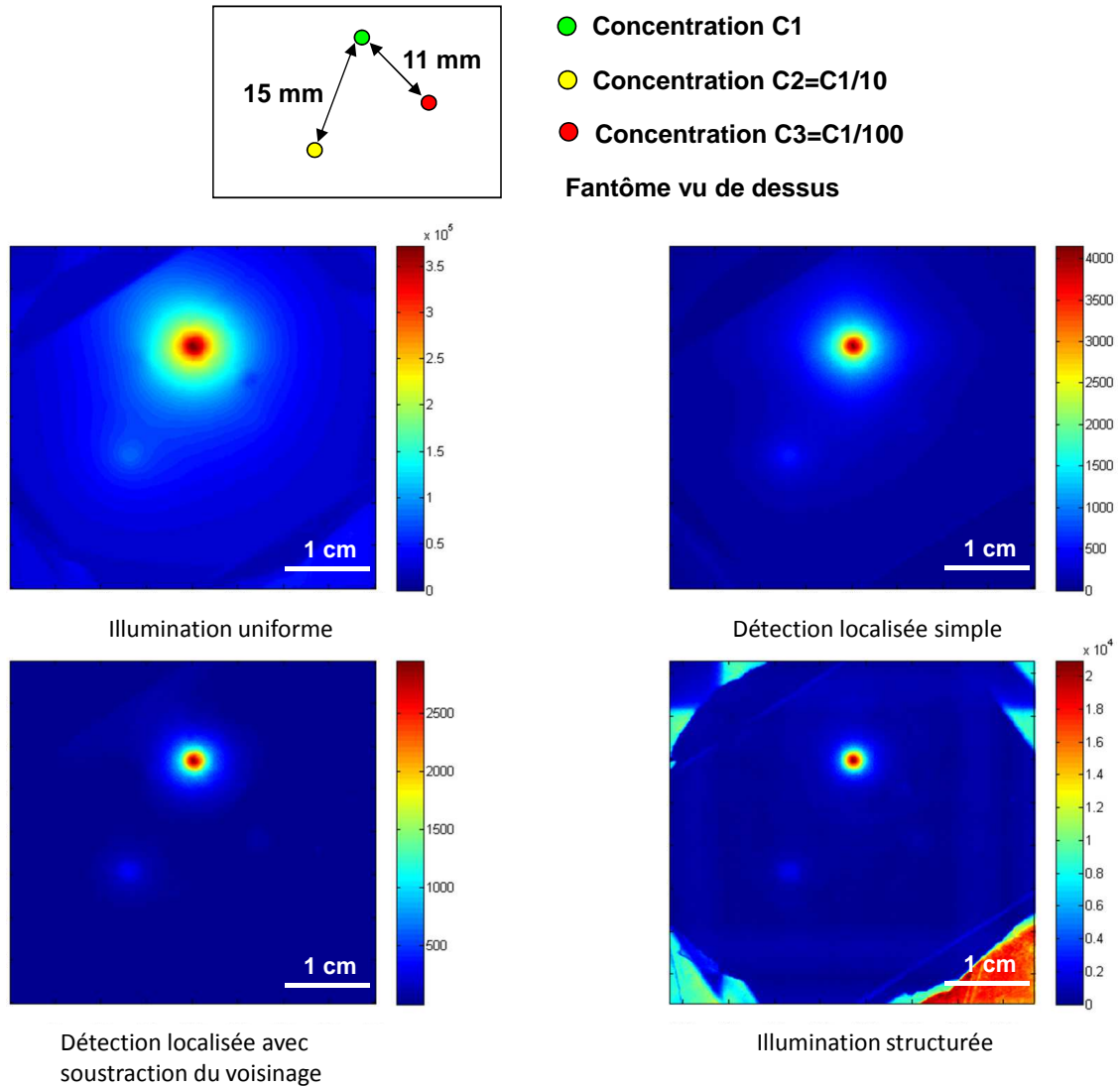


FIGURE 4.32 – Description du fantôme étudié avec trois concentrations et images obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée.

On voit sur la figure 4.32 les résultats obtenus avec le deuxième fantôme (la configuration des inclusions fluorescentes est rappelée en haut de la figure). Dans ce cas, on considère trois concentrations différentes, une concentration $C1$ de $10 \mu\text{M}$, une concentration $C2$ dix fois plus faible et une concentration $C3$ cent fois plus faible. Les inclusions sont à 2 mm de profondeur. Les paramètres utilisés avec la détection localisée sont les paramètres basiques (détection sur l'excitation en détection localisée simple et taille de voisinage de 1 mm en détection localisée avec soustraction du voisinage), la fréquence optimale a été choisie en illumination structurée et elle est là aussi de $0,15 \text{ mm}^{-1}$.

Sur l'image obtenue en illumination uniforme, on voit que l'on détecte l'inclusion à la concentration $C1$. On peut distinguer l'inclusion à la concentration $C2$ malgré la diffusion car la distance entre les deux inclusions est suffisamment grande. En revanche, il est impossible de voir l'inclusion à la concentration $C3$. Avec la détection localisée simple, on sépare mieux l'inclusion à la concentration $C2$ et on commence à distinguer l'inclusion à la concentration $C3$. La détection localisée avec soustraction du voisinage offre là encore les meilleures performances : on a une séparation nette entre les deux premières inclusions, et on peut voir l'inclusion à la concentration $C3$. Cette détection est toutefois limitée par la dynamique de notre image dans ce cas où les concentrations sont très différentes. Enfin, l'illumination structurée offre des résultats comparables à celle observée en détection localisée avec soustraction du voisinage, mais on constate là encore qu'il subsiste des artefacts dus au niveau de fluorescence de fond. Les zones périphériques où le niveau de fluorescence est important sont dues au bord du fantôme.

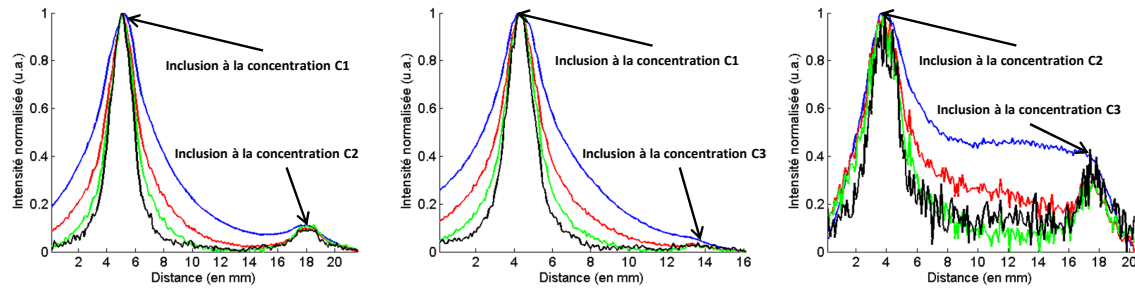


FIGURE 4.33 – Profils d'intensité normalisés pour les images en illumination uniforme (—), détection localisée simple (—), détection localisée avec soustraction du voisinage (—) et illumination structurée (—); les profils étudiés sont pris le long de deux inclusions aux concentrations $C1$ et $C2$ (à gauche), $C1$ et $C3$ (au centre), et $C2$ et $C3$ (à droite).

Sur la figure 4.33, on a tracé les profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions aux concentrations $C1$ et $C2$ obtenus avec les quatre méthodes présentées sur la figure 4.32.

On retrouve les constatations faites précédemment, à savoir qu'il est possible de détecter l'inclusion à la concentration $C2$ en illumination uniforme mais pas celle à la concentration $C3$ à cause de la diffusion du signal de fluorescence de l'inclusion à la concentration $C1$. La détection localisée simple permet de distinguer les inclusions aux concentrations $C2$ et $C3$, mais, comme dans le cas précédent, les meilleures performances sont obtenues avec la détection localisée avec soustraction du voisinage et avec l'illumination structurée. Avec cette dernière méthode, on voit toutefois que le niveau du pic d'intensité de l'inclusion à la concentration $C3$ est proche du niveau de fond lorsqu'on la compare à l'inclusion à la concentration $C1$. Ceci est moins problématique lorsqu'on compare les inclusions aux concentrations $C2$ et $C3$.

Dans ce cas, on retrouve le facteur 10 entre les niveaux des pics d'intensité des inclusions aux concentrations $C1$ et $C2$. En revanche, le rapport entre les niveaux des pics d'intensité des inclusions aux concentrations $C1$ et $C3$ est de 25 environ et celui entre les pics d'intensité des inclusions aux concentrations $C2$ et $C3$ est de 2,5. Bien que certaines variations pourraient être dues à un biais expérimental lors de la préparation des inclusions, ceci tend à montrer

qu'il est difficile d'être quantitatif malgré l'amélioration en résolution.

4.3.3 Fantômes avec une forte autofluorescence

4.3.3.1 Amélioration de la résolution avec le fantôme à deux capillaires

Comme dans le cas de l'amélioration du contraste, nous avons testé nos méthodes dans un cas d'autofluorescence très défavorable. Nous avons tout d'abord réalisé une deuxième série de mesures avec le fantôme à deux capillaires mais avec un niveau d'autofluorescence plus important (concentration de fluorophore dans le fantôme cinq fois supérieure). Seules 8 profondeurs ont été considérées, le signal devenant inexploitable plus rapidement que dans le cas précédent.

Sur la figure 4.34, on peut voir les résultats obtenus en illumination uniforme. On remarque un comportement global similaire à celui observé précédemment, la différence étant que les capillaires ne sont plus séparables dès le deuxième millimètre. Le rapport entre le pic d'intensité des capillaires et le creux entre eux n'est plus que de 20% environ lorsque les capillaires sont à 1 mm de profondeur.

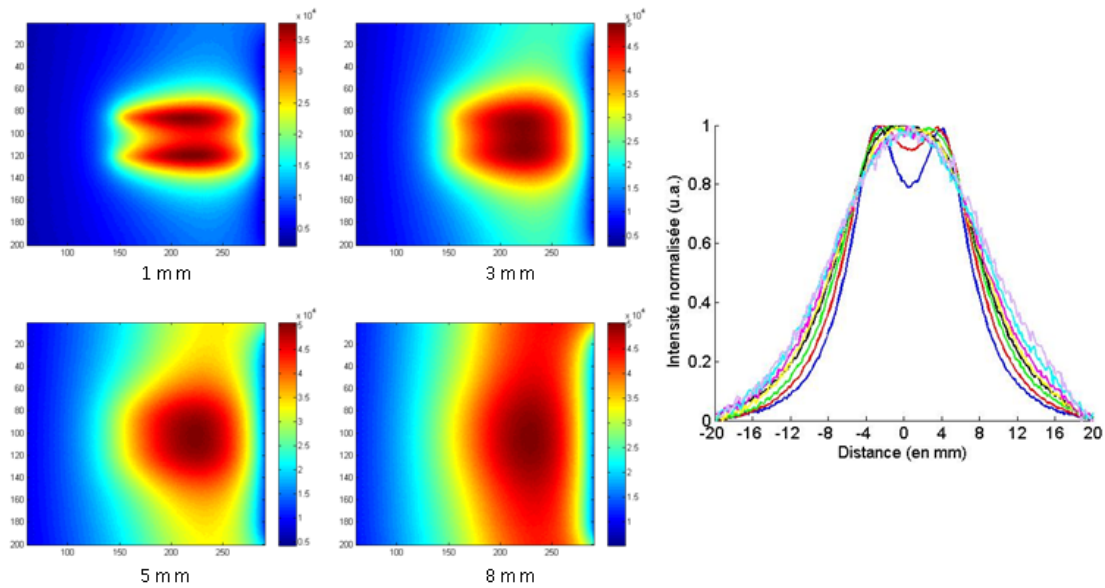


FIGURE 4.34 – **A gauche : Images obtenues en illumination uniforme pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—).**

La figure 4.35 montre quant à elle les résultats obtenus avec la détection localisée simple. Cette méthode améliore la résolution par rapport à l'illumination uniforme, mais les limites apparaissent plus rapidement que dans le cas avec une faible autofluorescence : il est impossible de distinguer les capillaires à partir du quatrième millimètre. Le rapport entre le pic d'intensité

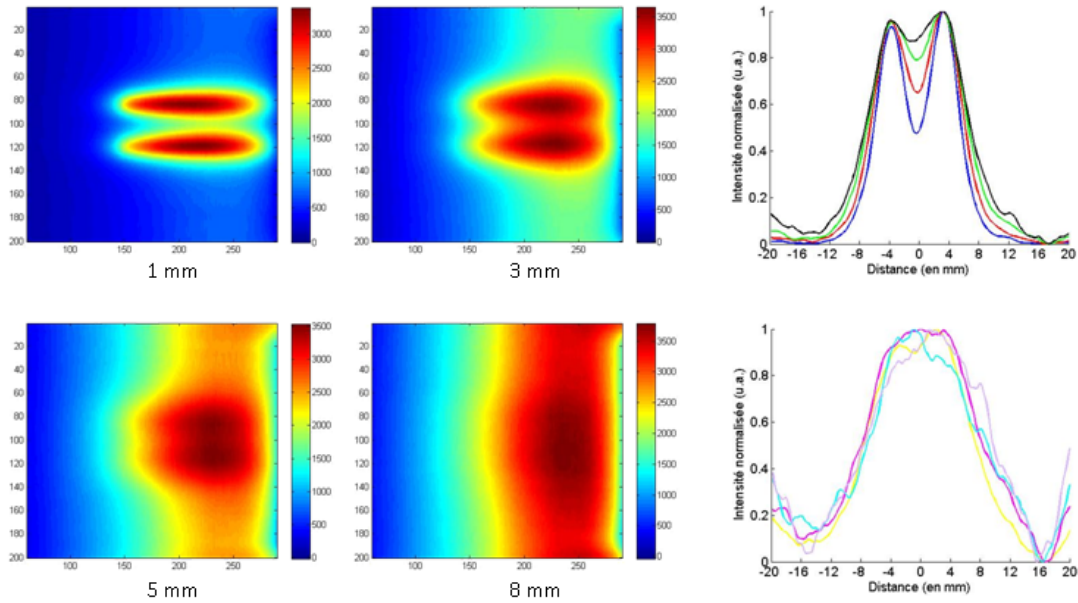


FIGURE 4.35 – **A gauche : Images obtenues en détection localisée simple pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—).**

des capillaires et le creux entre eux est quant à lui de 50% environ lorsque les capillaires sont à 1 mm de profondeur.

Les résultats obtenus en détection localisée avec soustraction du voisinage sont présentés sur la figure 4.36. Comme pour la détection localisée simple, on remarque une nette amélioration de résolution par rapport à l'illumination uniforme malgré la présence d'autofluorescence. Cependant, les limites apparaissent aussi à une profondeur moins grande, la séparation des capillaires n'étant plus réalisable à partir de 6 mm. Contrairement à la détection localisée simple, le rapport entre le pic d'intensité des capillaires et le creux entre eux reste très bon (environ 95 %) lorsque les capillaires sont à 1 mm de profondeur.

Enfin, les résultats obtenus avec l'illumination structurée sont présentés en figure 4.37. On voit que la séparation des capillaires est bonne sur les 4 premiers millimètres, même si les effets de bord présents sont plus importants que dans le cas d'une faible autofluorescence. Passée cette profondeur, il n'est toutefois plus possible de discerner les capillaires avec certitude, leur signal étant noyé dans le bruit. Comme pour la détection localisée avec soustraction du voisinage, on conserve un très bon rapport entre le pic d'intensité des capillaires et le creux entre eux (environ 95 %) malgré la présence d'autofluorescence.

Pour ce cas avec une autofluorescence plus importante on peut là aussi conclure en faisant le constat que chacune des techniques présentées offre une amélioration en termes de résolution par rapport à l'illumination uniforme, cette amélioration étant toutefois inférieure à celle observée dans le cas précédent.

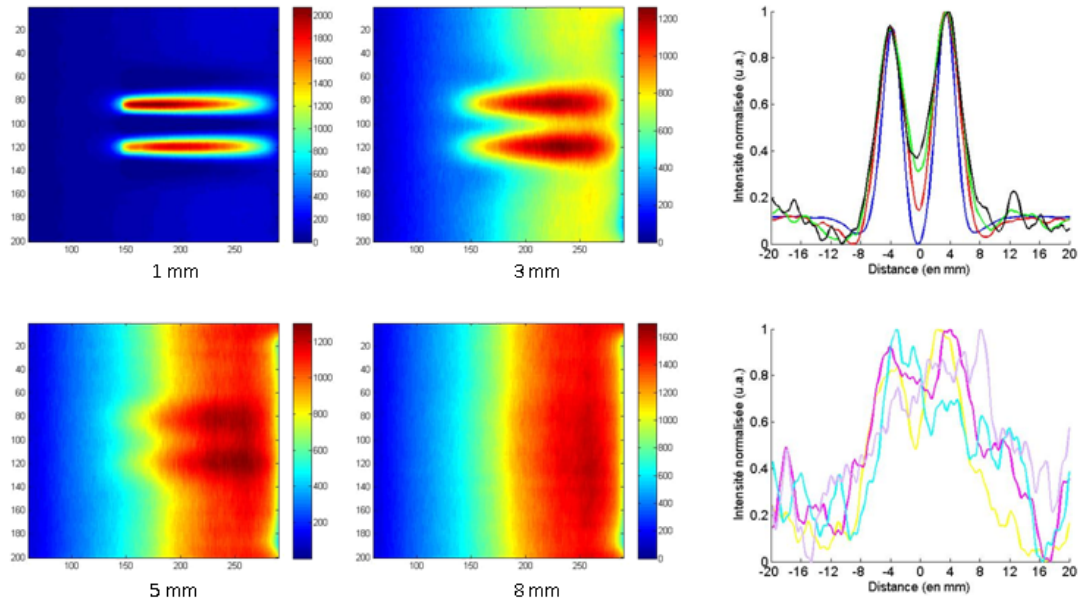


FIGURE 4.36 – A gauche : Images obtenues en détection localisée avec soustraction du voisinage pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—).

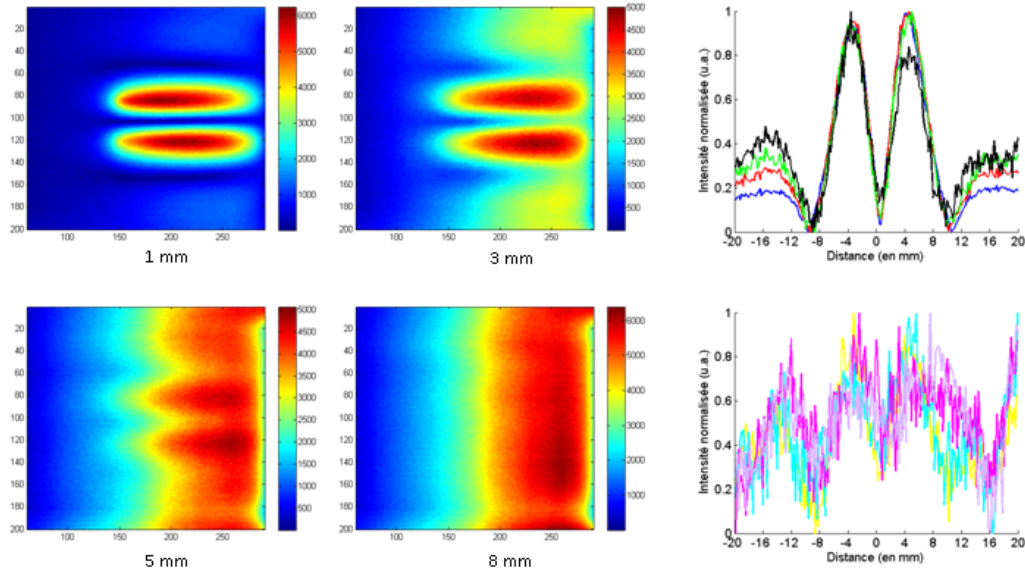


FIGURE 4.37 – A gauche : Images obtenues en illumination structurée pour quatre profondeurs différentes ; A droite : Profils d'intensité normalisés pour des inclusions à : 1 mm (—), 2mm (—), 3mm (—), 4mm (—), 5mm (—), 6mm (—), 7mm (—), 8mm (—)

La technique offrant les meilleures performances reste l'illumination structurée, les artéfacts étant cependant visible encore plus rapidement du fait de l'autofluorescence plus importante.

La remarque faite concernant les techniques de détection localisée reste la même : elles améliorent la résolution par rapport à l'illumination uniforme dans une moindre mesure mais offrent l'avantage d'être beaucoup plus simple à implémenter.

On notera comme dans l'expérience précédente réalisée sur ce fantôme que pour obtenir ces résultats nous avons réalisé un balayage de la ligne parallèle aux capillaires.

4.3.3.2 Amélioration de la résolution avec la mire de fluorescence : méthodes de détection localisée et méthode d'illumination structurée

Nous avons aussi étudié l'amélioration de résolution apportée par nos méthodes avec la mire de fluorescence pour un niveau d'autofluorescence plus important (donc défavorable). Comme dans le cas avec un niveau d'autofluorescence réaliste, la somme de deux sens de balayage perpendiculaires a été utilisée pour les résultats qui vont suivre.

Sur la figure 4.38, on a représenté les images obtenues en illumination uniforme, en détection localisée simple et avec soustraction du voisinage, et en illumination structurée, lorsque la mire de résolution fluorescente est immergée dans un fantôme liquide à quatre profondeurs différentes comprises entre 1 et 4 mm. On étudie alors l'amélioration de la détection en profondeur associée à l'amélioration de la résolution apportée par nos méthodes. Comme dans le cas avec une autofluorescence réaliste, nous avons utilisé des paramètres de base pour les méthodes de détection localisée (détection sur l'excitation en détection localisée simple, et taille de voisinage de 1 mm pour la détection localisée avec soustraction du voisinage). Nous nous plaçons alors dans un cas réaliste où aucune information sur la profondeur ne serait disponible *a priori*. Pour l'illumination structurée, la fréquence spatiale optimale a été choisie après traitement parmi les dix fréquences considérées comprises entre 0,025 et 0,25 mm⁻¹. Pour cette dernière méthode, on notera dans ce cas que le champ imagé n'est plus totalement exploitable à cause des artéfacts qui apparaissent avec le haut niveau de signal de fond dû à l'autofluorescence. Les zones non exploitables du champ ont été hachurées sur les images en illumination structurée. On peut noter que plus on regarde en profondeur, plus on doit utiliser une fréquence spatiale petite, et plus la zone impactée par les artéfacts est grande. Comme nous l'expliquions dans la section 2.4.2 du chapitre 2, effectuer un balayage sur une zone plus grande permettrait d'augmenter la taille du champ utile afin de de plus être gêné par les artéfacts.

En illumination uniforme (première colonne), on ne distingue correctement la mire qu'à la profondeur de 1 mm comme c'était déjà le cas avec une autofluorescence réaliste. On remarque toutefois que la résolution est moins bonne à cause du niveau de fond plus grand venant s'ajouter au signal de fluorescence diffusé des inclusions. La superposition des signaux entre les différents groupes d'inclusions est donc encore plus importante que dans le cas précédent. À 2 mm, on ne distingue plus les cinq groupes d'inclusions, les signaux provenant des trois groupes d'inclusions les plus larges se recouvrent pour ne former qu'un unique signal de fluorescence plus large. On est toutefois encore capable de distinguer certaines inclusions individuelles

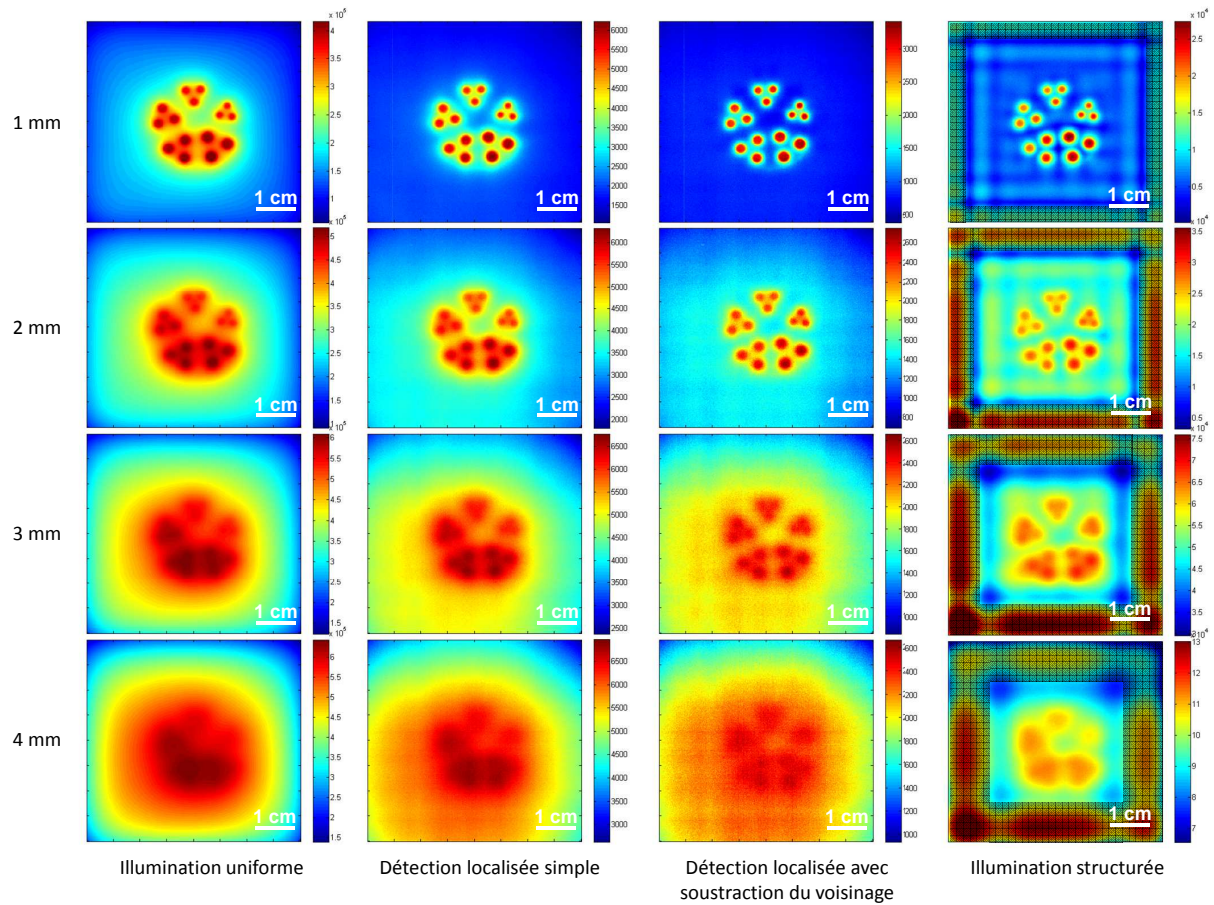


FIGURE 4.38 – Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée; en illumination structurée, on a hachuré la partie non utilisable du champ imagé qui est due aux artefacts apparaissant avec un haut niveau de signal de fond (dû à l'autofluorescence dans ce cas).

dans les groupes les plus larges. À 3 mm, la mire entière n'émet plus qu'un unique signal de fluorescence et on ne peut plus résoudre les différents groupes d'inclusions fluorescentes. À 4 mm, le signal unique de fluorescence devient encore plus uniforme, il est impossible de distinguer la forme réelle de la mire.

En détection localisée simple (deuxième colonne), les résultats sont sensiblement meilleurs. Cette méthode améliore la résolution car elle augmente le ratio entre le niveau des pics des inclusions fluorescentes et le fond, mais il reste tout de même une contribution du signal de fond dû à la diffusion. À 1 mm, les inclusions individuelles sont visibles pour chacun des groupes. À 2 mm, on distingue chacun des groupes d'inclusions mais il n'est plus possible de séparer clairement les inclusions individuelles, surtout pour les groupes d'inclusions les plus petites. À 3 mm, on atteint les limites de la méthode comme dans le cas de l'autofluorescence réaliste. Il devient très difficile de distinguer les différents groupes d'inclusions, leurs signaux

diffusés s'additionnant au signal d'auto fluorescence. À 4 mm, la mire ne forme plus qu'un unique signal de fluorescence large comme on pouvait l'avoir en illumination uniforme à 3 mm.

La détection localisée avec soustraction du voisinage (troisième colonne) offrent de bonnes performances pour les premières profondeurs, le signal de fond est correctement supprimé de manière à augmenter le ratio entre le niveau des pics des inclusions fluorescentes et le fond. À 1 mm, on distingue très nettement chacune des inclusions individuelles dans tous les groupes. À 2 mm, la résolution est bonne, le niveau de fond augmente mais on distingue encore chacune des inclusions pour tous les groupes. À 3 mm, il n'est plus possible de voir les inclusions individuelles, mais on peut tout de même distinguer les groupes d'inclusions. À 4 mm, les limites de la méthode sont atteintes, le signal de fluorescence des inclusions est perdu dans le signal de fond du fantôme.

Enfin, l'illumination structurée (quatrième colonne) offre elle aussi de bonnes performances, la séparation entre les différents groupes étant sensiblement meilleure pour les profondeurs à 3 et 4 mm. Ceci s'explique par le fait que, comme nous l'avons mentionné précédemment, la fréquence spatiale optimale a été sélectionné *a posteriori*, contrairement à la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage où la taille du voisinage a été choisie au préalable et n'a donc pas été optimisée. On notera cependant que des artefacts sont visibles sur ces images à cause du fort niveau de fond du fantôme.

Comme pour le cas précédent avec une auto fluorescence réaliste, on a tracé, sur la figure 4.39, les profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes d'inclusions de la mire (les lignes le long desquelles les profils ont été pris sont indiquées sur l'image en haut de la figure). On compare les profils obtenus avec les quatre méthodes présentées sur la figure 4.38 pour les quatre profondeurs considérées.

Sur ces profils, on peut voir de manière plus détaillée ce que l'on a constaté sur la figure 4.38. Ainsi, la détection localisée simple améliore de manière générale la résolution par rapport à l'illumination uniforme, et le gain est encore plus important en détection localisée avec soustraction du voisinage ou en illumination structurée. Pour ce niveau d'auto fluorescence, les performances obtenues avec ces deux dernières méthodes sont encore plus proches, l'optimisation effectuée pour l'illumination structurée n'apportant pas de réelle amélioration par rapport à la détection localisée avec soustraction du voisinage lorsqu'on s'intéresse uniquement à la séparation entre les inclusions d'un même groupe. Pour donner quelques exemples quantitatifs d'amélioration, à 1 mm, le rapport entre le pic d'intensité des inclusions du groupe 1 et le creux entre eux est de 45 % environ en illumination uniforme, de 65% en détection localisée simple, de 85 % en détection localisée avec soustraction du voisinage et de 90 % en illumination structurée. Pour les inclusions du groupe 5 à 1 mm, le rapport est de 45 % environ en illumination uniforme, de 55% en détection localisée simple, de 70 % en détection localisée avec soustraction du voisinage et de 65 % en illumination structurée. À cette profondeur, on a donc des améliorations semblables à celles qu'on avait avec l'auto fluorescence réaliste.

On voit toutefois qu'il n'est plus possible de séparer les inclusions au sein des groupes à partir d'une profondeur de 3 mm, même pour les groupes d'inclusions 1 et 2, contrairement au cas précédent.

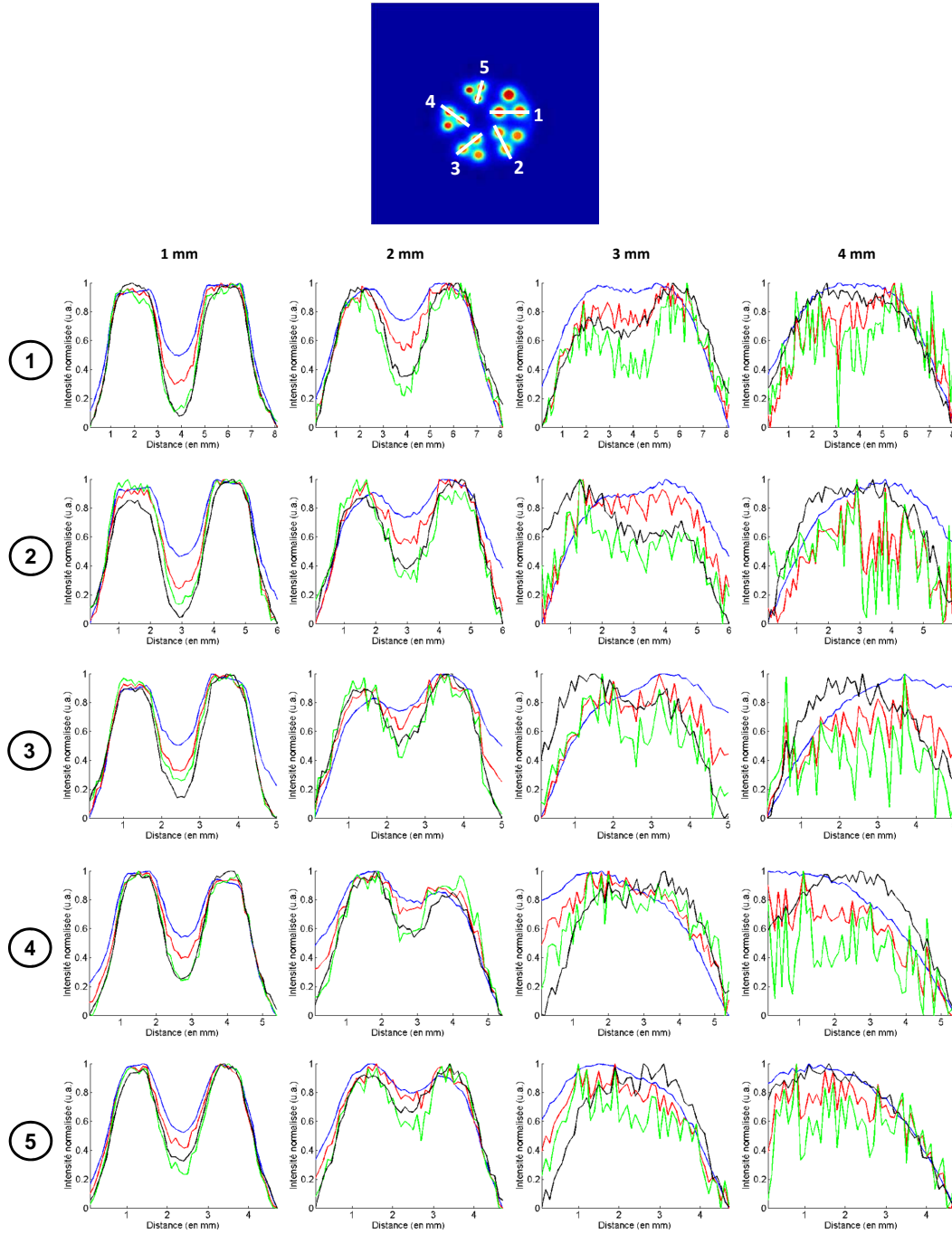


FIGURE 4.39 – Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes (tels que décrit dans l'image) à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm : illumination uniforme (—), détection localisée simple (—), détection localisée avec soustraction du voisinage (—) et illumination structurée (—).

En résumé, comme on l'avait vu avec les résultats sur le contraste, les méthodes proposées permettent d'améliorer la résolution par rapport à l'illumination uniforme même dans un cas avec une autofluorescence cinq fois plus importante. Les limites des méthodes sont toutefois atteintes à des profondeurs plus proches de la surface. Comme dans le cas avec une autofluorescence réaliste, les deux méthodes offrant les meilleures performances en terme d'amélioration de la résolution sont donc la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage ainsi que la méthode d'illumination structurée. La méthode de détection localisée simple permet aussi d'améliorer la résolution par rapport à l'illumination uniforme, même si cette amélioration est moins importante.

4.3.3.3 Amélioration de la résolution avec la mire de fluorescence : méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation

Sur la figure 4.40, on a cette fois montré les images de la mire que l'on obtient avec les méthodes de modélisation du signal parasite par l'excitation (les images en illumination uniforme ont été rappelées pour faciliter la comparaison).

Avec la méthode de modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux (deuxième colonne), on remarque que l'on améliore sensiblement la résolution. Ceci est surtout visible à 1 mm, la suppression de l'autofluorescence par la méthode entraînant une meilleure séparation des pics d'intensité de fluorescence. À 2 mm, il est impossible de distinguer clairement les inclusions individuelles, mais la séparation entre certains groupes d'inclusions est tout de même meilleure qu'en illumination uniforme (notamment le groupe d'inclusions les plus petites). À 3 mm, les signaux de fluorescence des différents groupes commencent à s'additionner pour ne plus former qu'un unique signal de fluorescence, ce signal étant encore plus homogène pour la profondeur de 4 mm. On peut toutefois noter que le signal de fluorescence de fond entourant la mire est très bien supprimé pour toutes les profondeurs considérées.

Avec la méthode de modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux (troisième colonne), on n'observe pas d'amélioration de la résolution par rapport à l'illumination uniforme, et ce quelle que soit la profondeur. Comme pour la méthode de modélisation avec les paramètres locaux, on a tout de même une très bonne suppression du signal de fluorescence de fond entourant la mire pour toutes les profondeurs.

On a tracé, sur la figure 4.41, les profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes d'inclusions de la mire (les lignes le long desquelles les profils ont été pris sont indiquées sur l'image en haut de la figure). On compare les profils obtenus avec les trois méthodes présentées sur la figure 4.40 pour les quatre profondeurs considérées.

Sur ces profils, on peut voir de manière plus détaillée ce que l'on a constaté sur la figure 4.40. Ainsi, on voit que seule la méthode de modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux permet d'améliorer la séparation entre les inclusions, les résultats obtenus avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux étant comparables à ceux obtenus en illumination uniforme, voire moins bons. Pour donner quelques exemples quantitatifs d'amélioration, à 1 mm, le rapport entre le pic d'intensité des inclusions du groupe 1 et le creux entre eux est de 45 % environ en illumination uniforme, de 60% avec la modélisation par l'excitation

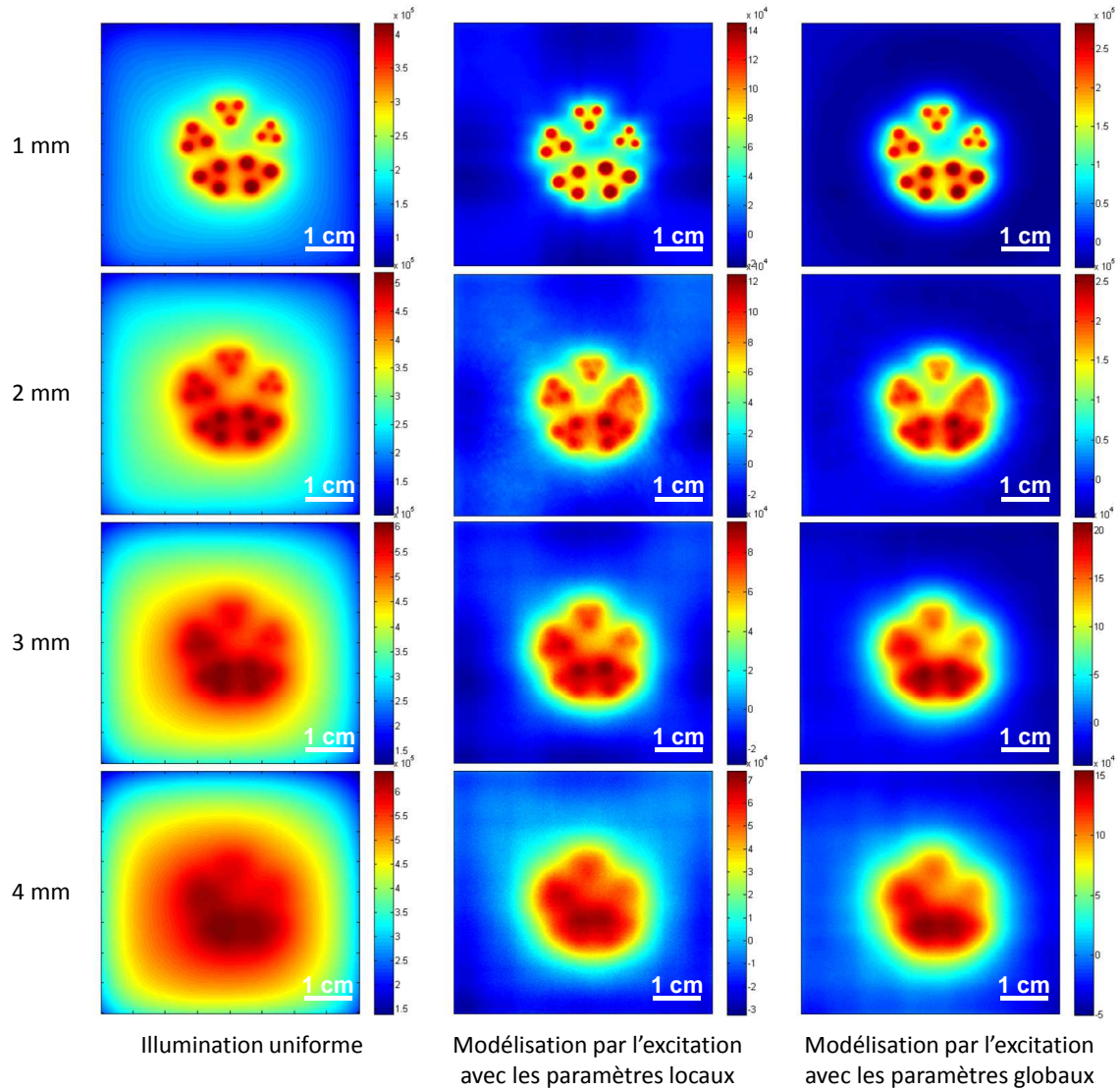


FIGURE 4.40 – Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm obtenues en illumination uniforme (première colonne) et avec modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres locaux (deuxième colonne) et avec les paramètres globaux (troisième colonne).

avec les paramètres locaux et de 40 % avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux. Pour les inclusions du groupe 5 à 1 mm, le rapport est de 45 % environ en illumination uniforme, de 65% avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux et de 40 % avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux.

À partir d'une profondeur de 3 mm, on constate que ces deux méthodes n'améliorent plus la séparation des inclusions.

En résumé, on retrouve ainsi les constatations faites en simulation, à savoir que la modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux est plus adaptée lorsqu'on veut augmenter

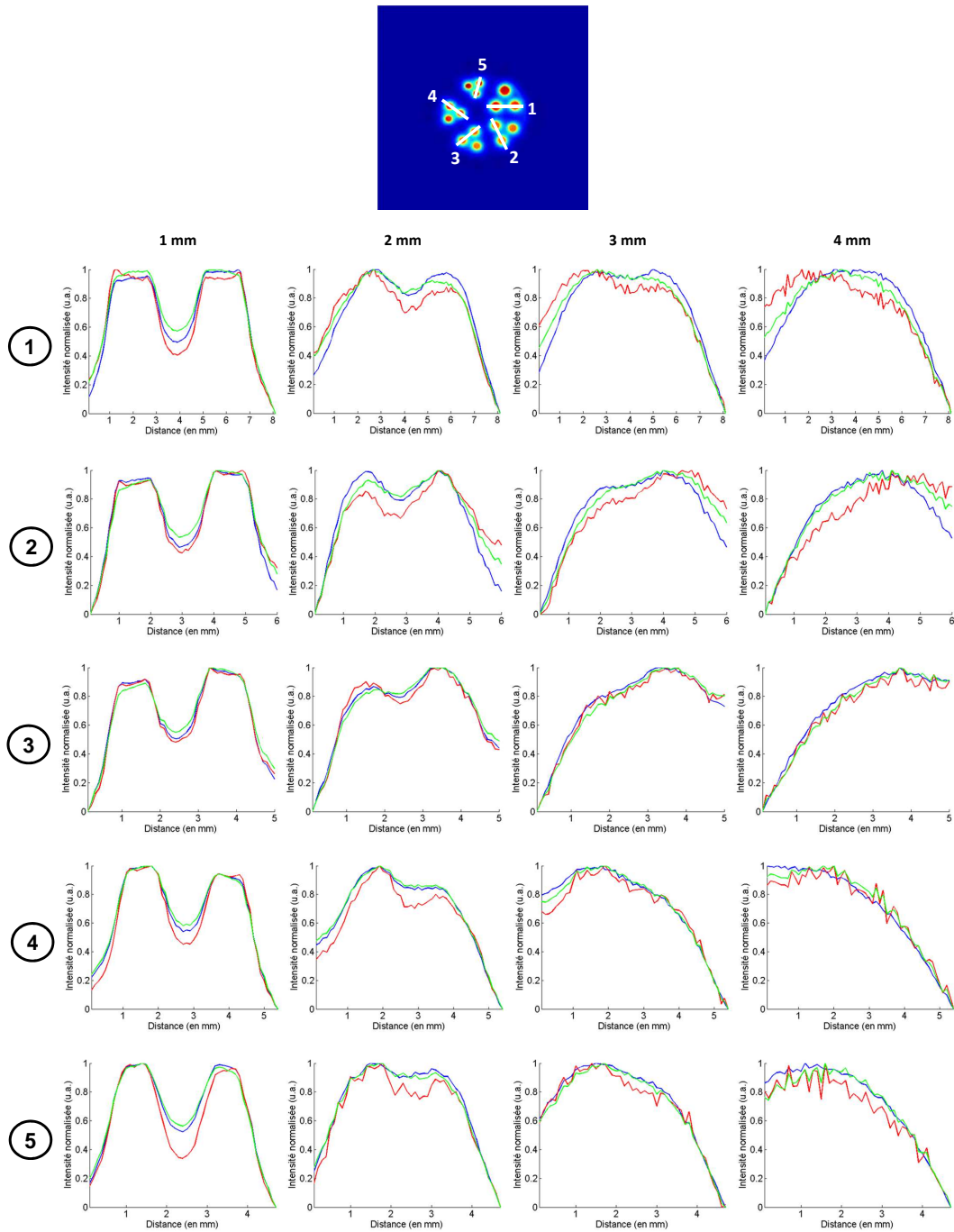


FIGURE 4.41 – Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes (tels que décrit dans l'image) à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm : illumination uniforme (—), modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux (—) et modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux (—).

la résolution des cibles fluorescentes. L'amélioration apportée par cette dernière est toutefois moins importante que celle apportée par les méthodes de détection localisée et la méthode d'illumination structurée. L'intérêt de ces méthodes de modélisation est surtout la suppression du signal de fluorescence de fond.

4.3.3.4 Amélioration de la résolution avec la mire de fluorescence : augmentation de la sensibilité aux couches superficielles

Pour cette dernière série de résultats, nous allons présenter les images obtenues avec la mire de fluorescence dans le cas d'un fantôme fortement autofluorescent (tel que décrit dans le reste de cette partie) dont la préparation était insuffisamment contrôlée. Cette préparation a produit un fantôme qui était non homogène, notamment au niveau de sa fluorescence et de son absorption : le fluorophore utilisé lors de la préparation a formé des agrégats et l'encre ne s'est pas mélangée correctement. Nous avons décidé de présenter ces résultats car les hétérogénéités du fantôme permettent tout de même de mettre en évidence l'intérêt de nos méthodes, celles-ci révélant des détails invisibles en illumination uniforme.

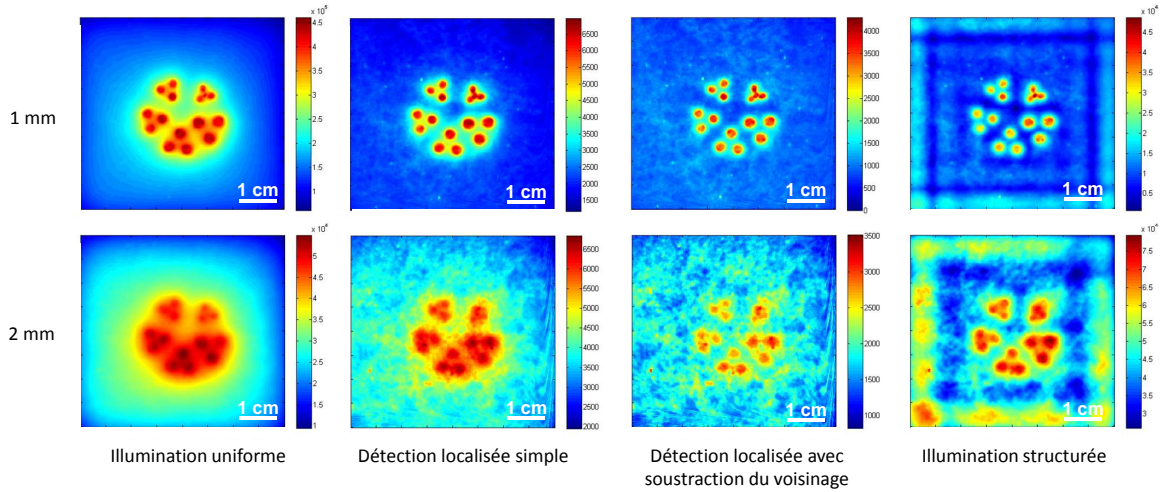


FIGURE 4.42 – Images de la mire de fluorescence à 1 et 2 mm obtenues en illumination uniforme, détection localisée simple, détection localisée avec soustraction du voisinage et illumination structurée dans le cas d'un fantôme fortement autofluorescent non homogène.

On présente, sur la figure 4.42, les images obtenues en illumination uniforme, en détection localisée simple, en détection localisée avec soustraction du voisinage et en illumination structurée. Comme dans les cas précédents, nous avons utilisé des paramètres de base pour les méthodes de détection localisée (détection sur l'excitation en détection localisée simple, et taille de voisinage de 1 mm pour la détection localisée avec soustraction du voisinage). Pour l'illumination structurée, la fréquence spatiale optimale a été choisie après traitement parmi les dix fréquences considérées comprises entre 0,025 et 0,25 mm^{-1} . Pour cette dernière méthode, comme pour les résultats présentés précédemment avec une forte autofluorescence, on notera que le champ imagé n'est plus totalement exploitable à cause des artéfacts qui apparaissent

avec le haut niveau de signal de fond dû à l'autofluorescence.

Concernant l'amélioration de la résolution au niveau des inclusions fluorescentes de la mire, celle-ci est comparable à celle que l'on a décrite précédemment : la détection localisée simple améliore la résolution de l'illumination uniforme, mais les meilleures performances sont obtenues avec la détection localisée avec soustraction du voisinage et la méthode d'illumination structurée.

Comme nous le mentionnions dans le paragraphe précédent, cette amélioration de résolution va nous permettre dans ce cas de distinguer des détails invisibles en illumination uniforme. En effet, pour les deux profondeurs considérées, les images en illumination uniforme ne présentent pas de différences notables avec celles présentées en figure 4.38 : seuls les signaux de la mire de fluorescence sont détectés. En revanche, avec la détection localisée simple, on commence à distinguer des hétérogénéités dans le signal de fond : on distingue des points de fluorescence (dus aux agrégats de fluorophore) ainsi que des “volutes” dans le signal d'autofluorescence (dus au mauvais mélange de l'encre dans le fantôme entraînant des hétérogénéités d'absorption). Ces détails deviennent encore plus contrastés en détection localisée avec soustraction du voisinage et en illumination structurée (les artefacts entraînant cependant pour cette méthode une superposition du motif sinusoïdal au signal d'autofluorescence).

On a donc là un exemple de détails proches de la surface (les hétérogénéités dues à l'encre étant visibles à l'oeil nu) qui sont indétectables en illumination uniforme mais que l'on peut distinguer parfaitement avec nos méthodes, celles-ci permettant d'être sensible aux couches proches de la surface en utilisant les paramètres adéquats.

4.4 Sensibilité à la profondeur

Parmi les résultats présentés dans les sections précédentes, nous avons pu voir plusieurs fois des relations nettes entre la profondeur des inclusions et la variation de contraste observée par rapport à l'illumination uniforme.

La technique présentant la sensibilité à la profondeur la plus évidente est l'illumination structurée. Cette caractéristique est connue pour l'illumination structurée implémentée de manière classique avec une illumination modulée sinusoïdalement en intensité. Nous allons voir, avec les résultats qui suivent, que nous conservons ce pouvoir de sectionnement optique en utilisant notre traitement *a posteriori* de la pile d'images obtenues avec le balayage de la ligne.

Pour mettre ceci en évidence, nous avons appliqué notre technique d'illumination structurée dans le cas du fantôme contenant quatre capillaires (présenté dans le chapitre 3).

On peut voir sur les figures 4.43 et 4.44 d'une part des exemples d'images obtenues à différentes fréquences spatiales de modulation et d'autre part les profils d'intensité de ces images comparés au profil du fantôme en illumination uniforme.

On retrouve les résultats attendus, à savoir que l'illumination structurée permet de faire

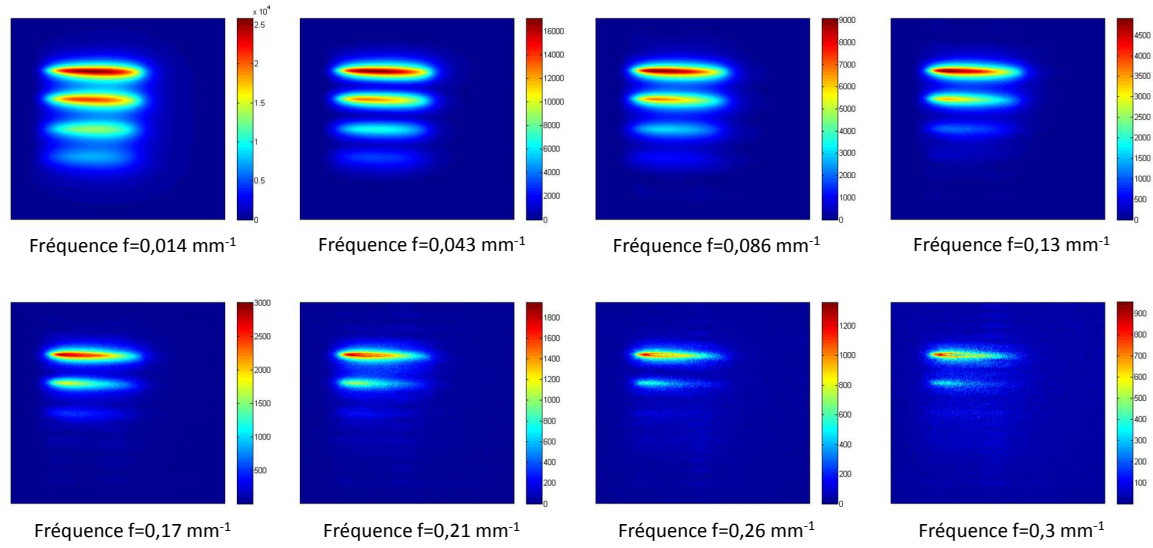


FIGURE 4.43 – Images du fantôme à quatre capillaires obtenues en illumination structurée à différentes fréquences spatiales : on détecte de moins en moins les capillaires en profondeur au fur et à mesure que l'on augmente la fréquence d'illumination.

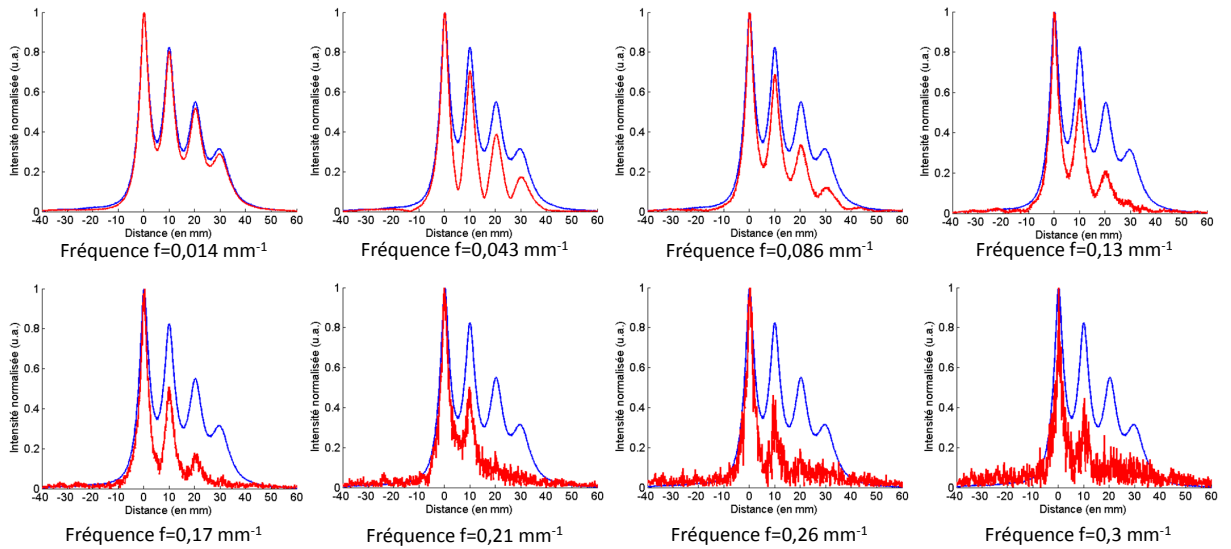


FIGURE 4.44 – Profils d'intensité pris perpendiculairement aux capillaires obtenus avec les différentes fréquences spatiales (en rouge) comparés au profil obtenu avec une illumination uniforme (en bleu).

du sectionnement à différentes profondeurs dépendant de la fréquence de l'illumination : plus la fréquence de l'illumination sera grande, plus la tranche sondée sera proche de la surface.

Cela montre donc qu'il est possible de faire du sectionnement optique grâce à un balayage de ligne en utilisant une recombinaison des images pour simuler une illumination structurée.

Il faudrait cependant comparer avec une véritable illumination structurée pour savoir si le pouvoir de sectionnement est le même que dans notre cas.

Il serait aussi intéressant de faire cette comparaison pour les expériences avec le fantôme à deux capillaires placés à différentes profondeurs. On pourrait ainsi vérifier si la fréquence spatiale offrant la meilleure séparation reste la même quelle que soit la profondeur des capillaires avec une véritable illumination structurée.

En plus de l'illumination structurée, on a aussi vu un lien entre le contraste observé avec les techniques de détection localisée et la profondeur des inclusions étudiées en fonction de l'implémentation des techniques.

Par exemple, dans le cas de la détection localisée simple, on a vu que le contraste varie différemment avec la distance entre la ligne d'excitation et la bande de détection pour des profondeurs d'inclusion différentes.

De même, pour la détection localisée avec soustraction du voisinage, on a pu noter que la forme de la courbe de contraste en fonction de la taille du voisinage soustrait dépend de la profondeur de l'inclusion observée.

Nous verrons dans la section présentant les résultats obtenus en *in vivo* comment cette variation de la profondeur sondée peut nous aider dans un cas concret.

4.5 Utilisation séquentielle des méthodes pour améliorer leurs résultats

Tous les résultats présentés précédemment ont été obtenus en appliquant une des méthodes à la fois. Nous avons aussi essayer de combiner certaines d'entre elles afin de voir s'il était possible d'améliorer encore les résultats. On peut en effet combiner la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation avec les méthodes de détection localisée ou bien avec la méthode d'illumination structurée. Pour vérifier cela, nous nous sommes placés dans le cas de l'expérience de la mire de fluorescence immergée dans un fantôme avec un fort niveau d'autofluorescence.

Sur la figure 4.45, on présente les images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm obtenues en détection localisée simple et en détection localisée avec soustraction du voisinage, et on les compare avec les images obtenues en combinant ces méthodes de détection localisée avec la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres globaux.

Pour la détection localisée simple (première et deuxième colonnes), on voit que le fait d'appliquer au préalable la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux améliore les résultats pour toutes les profondeurs en réduisant le signal de fond. La séparation entre les inclusions reste toutefois inchangée.

Pour la détection localisée avec soustraction du voisinage (troisième et quatrième colonnes),

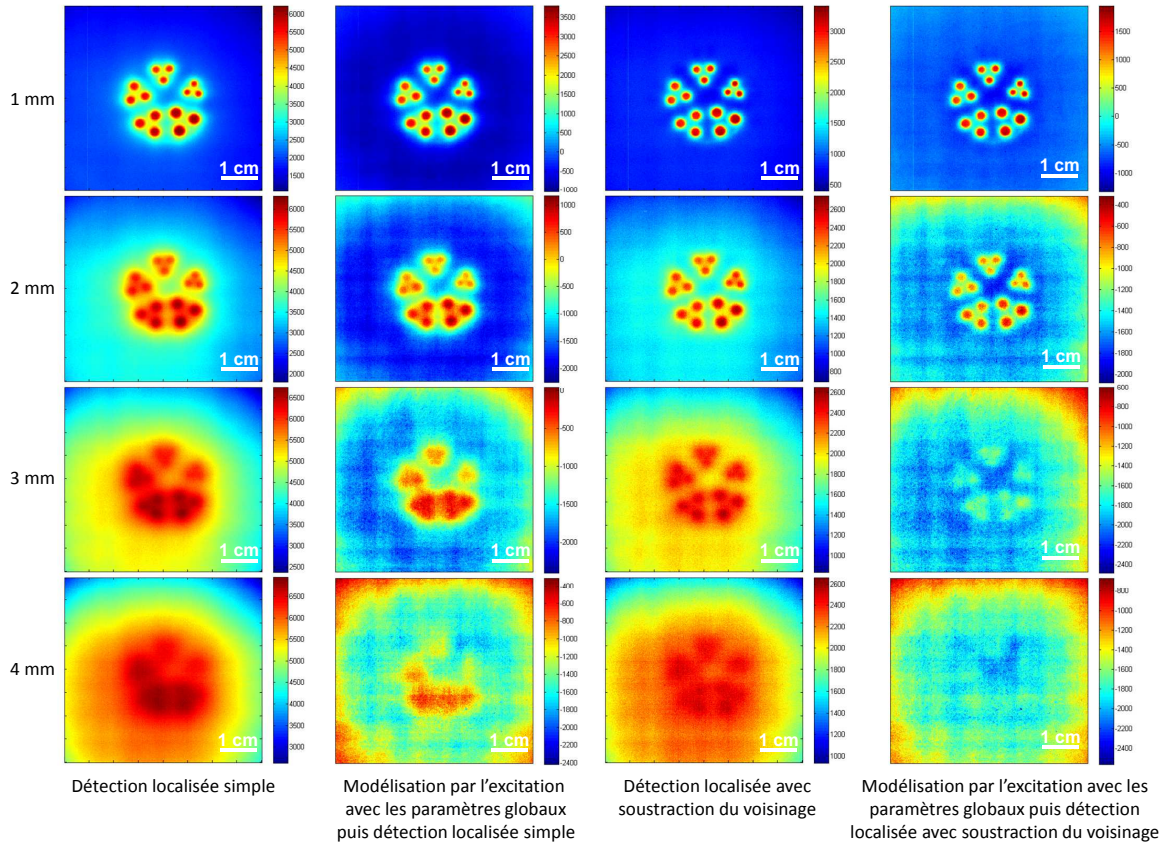


FIGURE 4.45 – Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm obtenues en détection localisée simple (première colonne), avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux combinée à la détection localisée simple (deuxième colonne), en détection localisée avec soustraction du voisinage (troisième colonne) et avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux combinée à la détection localisée avec soustraction du voisinage (quatrième colonne).

l'intérêt de la combinaison des méthodes est moindre. En effet, le signal de fond est réduit mais le signal des inclusions l'est lui aussi. À partir de 3 mm il n'est alors plus possible de distinguer le signal de fluorescence des inclusions.

Nous n'avons présenté que la combinaison des méthodes de détection localisée avec la modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres globaux car le fait d'utiliser les paramètres locaux entraîne des variations de signal trop fortes au niveau de la ligne d'excitation qui empêche la mise en oeuvre de la détection localisée.

Nous avons aussi essayé de combiner la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation avec la méthode d'illumination structurée. Sur la figure 4.46, on présente les images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm obtenues en illumination structurée, et on les compare avec les images obtenues en faisant la combinaison des méthodes (en utilisant les paramètres locaux et les paramètres globaux pour la méthode de

modélisation du signal parasite par l'excitation).

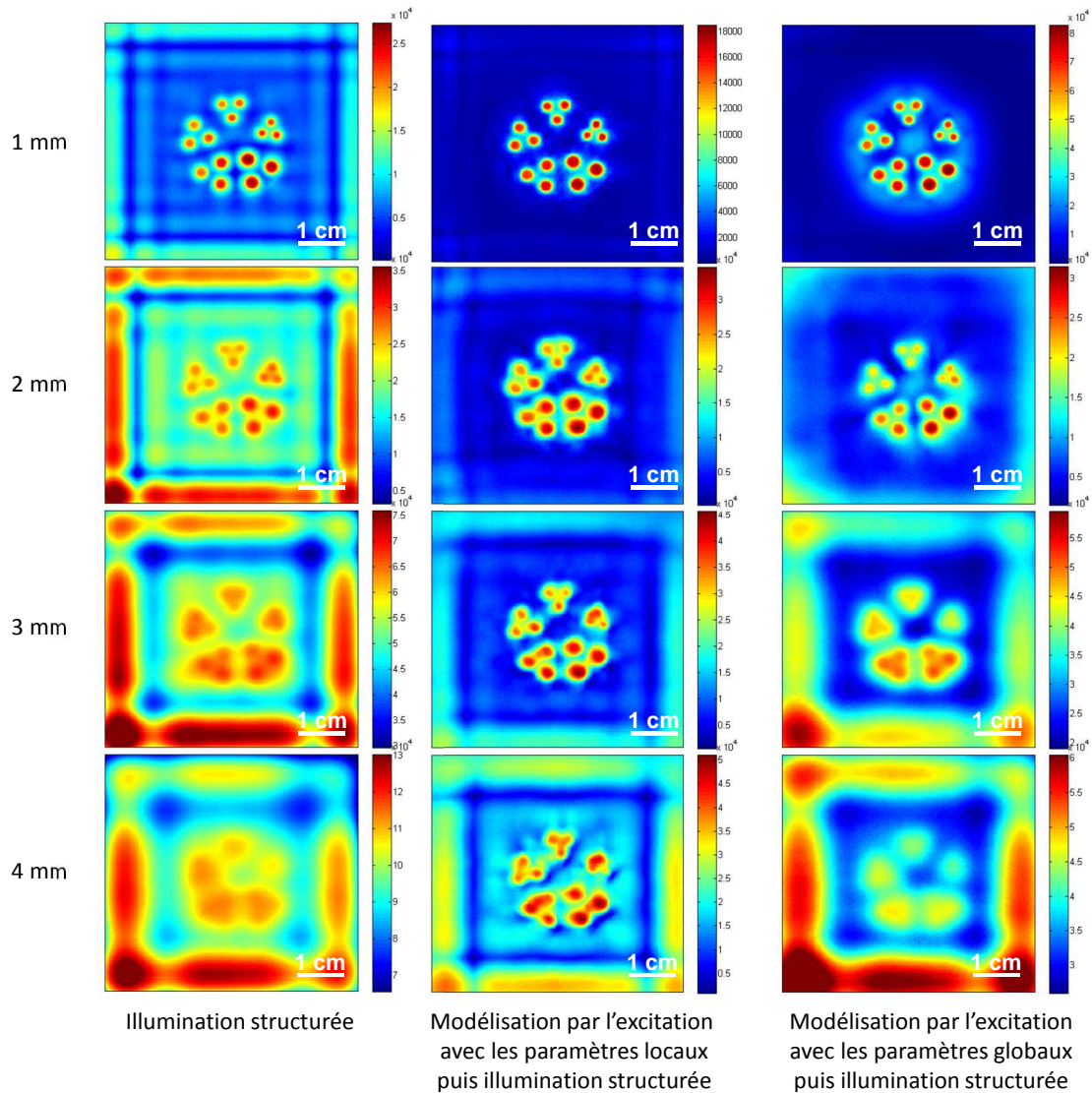


FIGURE 4.46 – Images de la mire de fluorescence à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm obtenues en illumination structurée (première colonne), avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux combinée à l'illumination structurée (deuxième colonne), et avec la modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux combinée à l'illumination structurée (troisième colonne).

Avec les paramètres locaux (deuxième colonne), on voit que la modélisation du signal parasite par l'excitation améliore les performances de l'illumination structurée (première colonne) de manière non négligeable. En effet, à 1 et 2 mm, la séparation des inclusions est très bonne, et le niveau du signal de fond est fortement réduit, diminuant d'autant les artéfacts apparaissant en illumination structurée. À 3 et 4 mm, le niveau du signal de fond est aussi réduit, mais on est en plus capable de distinguer les inclusions au sein des groupes, ce qui est impossible avec l'illumination structurée seule.

Avec les paramètres globaux (troisième colonne), la combinaison des méthodes est intéressante mais offre de moins bons résultats qu'avec les paramètres locaux. La réduction du niveau de signal de fond est en effet moins importante, et on ne distingue pas mieux les inclusions.

Sur la figure 4.47, on a tracé les profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes d'inclusions de la mire (les lignes le long desquelles les profils ont été pris sont indiquées sur l'image en haut de la figure). On compare les profils obtenus avec les trois méthodes présentées sur la figure 4.46 pour les quatre profondeurs considérées.

Sur ces profils, on peut voir de manière plus détaillée ce que l'on a constaté sur la figure 4.46. À la profondeur d'1 mm, on remarque que la séparation des inclusions dans les différents groupes est comparable avec les trois méthodes, avec un léger avantage pour la méthode d'illumination structurée utilisée seule. Il aurait cependant été possible d'améliorer cette séparation avec la combinaison des méthodes en choisissant une autre fréquence spatiale, mais cela aurait été fait au détriment de la réduction du signal de fond. Nous avons sélectionné cette fréquence car c'est celle qui offre le meilleur compromis entre l'amélioration de la résolution et l'augmentation du contraste liée à la réduction du signal d'autofluorescence. Cette constatation peut aussi être faite à la profondeur de 2 mm où la séparation des inclusions dans les différents groupes est aussi très proche pour les trois méthodes considérées. À la profondeur de 3 mm, les résultats sont encore comparables entre la méthode d'illumination structurée et la combinaison de la modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres globaux avec l'illumination structurée. On remarque cependant que la combinaison de la modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres locaux avec l'illumination structurée commence à être vraiment intéressante à cette profondeur. En effet, pour tous les groupes d'inclusions, en illumination uniforme, la séparation est quasi-nulle. L'illumination structurée permet d'augmenter sensiblement la séparation, mais, en la combinant avec la méthode de modélisation avec les paramètres locaux, on arrive à avoir une très bonne séparation. Le rapport entre le pic d'intensité des inclusions et le creux entre eux est par exemple d'environ 70 % pour le groupe d'inclusions 1 et d'environ 30 % pour le groupe d'inclusions 5. On peut faire le même constat à la profondeur de 4 mm. Avec la combinaison de l'illumination structurée et la modélisation avec les paramètres locaux, le rapport entre le pic d'intensité des inclusions et le creux entre eux est alors d'environ 60 % pour le groupe d'inclusions 1 et d'environ 25 % pour le groupe d'inclusions 5.

En résumé, nous avons présenté dans cette section deux exemples de combinaison des méthodes présentées dans ce manuscrit. Le fait d'appliquer au préalable la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation permet de diminuer le signal de fond et améliore ainsi les résultats obtenus en détection localisée et en illumination structurée. Si cette amélioration est intéressante en détection localisée, elle est encore plus notable en illumination structurée. Pour cette méthode, le fait de réduire le fond diminue les artéfacts observés, et on est même capable dans cet exemple de distinguer des détails à 4 mm qui sont totalement invisibles en illumination uniforme.

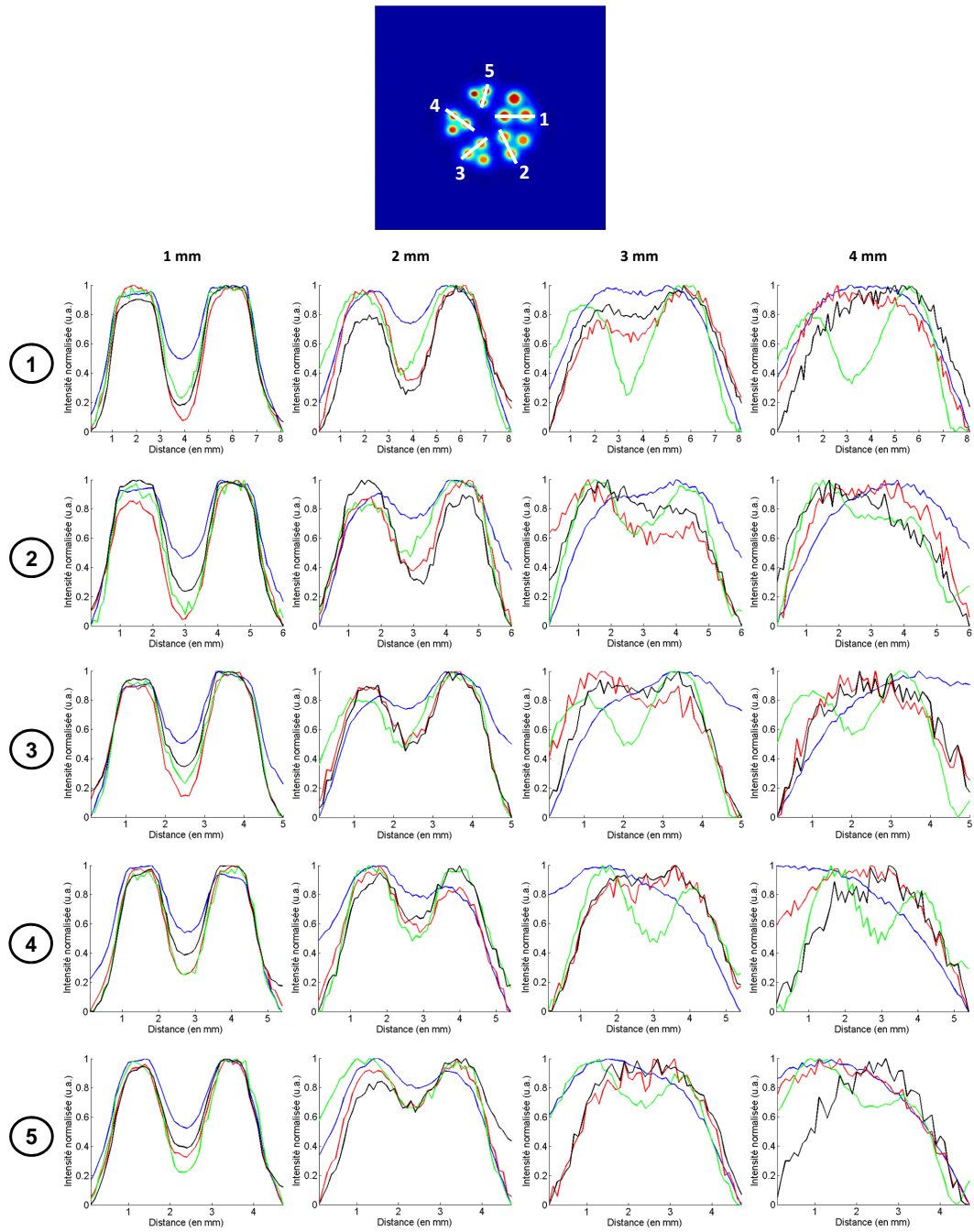


FIGURE 4.47 – Profils d'intensité normalisés pris le long de deux inclusions pour chacun des cinq groupes (tels que décrit dans l'image) à quatre profondeurs comprises entre 1 et 4 mm : illumination uniforme (—), illumination structurée (—), modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux combinée à l'illumination structurée (—) et modélisation par l'excitation avec les paramètres globaux combinée à l'illumination structurée (—).

4.6 Récapitulatif des résultats

On a regroupé dans le tableau suivant les principales remarques faites sur les différentes techniques étudiées concernant leurs performances sur l'amélioration du contraste et de la résolution.

| | Contraste | Résolution |
|--|--|--|
| Illumination uniforme | Perte de contraste rapide passée une certaine profondeur ou pour un niveau d'auto fluorescence trop important | Impossibilité de résoudre 2 objets proches passée une certaine profondeur ou pour un niveau d'auto fluorescence trop important |
| Détection localisée simple | Bonne amélioration du contraste pour les profondeurs proches de la surface, baisse de performances avec la profondeur et l'auto fluorescence | Résolution améliorée par rapport à l'illumination uniforme, mais baisse des performances en présence d'auto fluorescence trop importante |
| Détection localisée avec soustraction du voisinage | Meilleures performances proche de la surface, baisse importante des performances avec la profondeur et l'auto fluorescence | Résolution améliorée par rapport à la détection localisée simple, mais baisse des performances en présence d'auto fluorescence trop importante |
| Illumination structurée | Meilleures performances générales mais artéfacts présents quand l'auto fluorescence est trop forte | Très bonnes performances mais artéfacts présents quand l'auto fluorescence est trop forte |
| Modélisation du signal parasite par l'excitation | Très bonnes performances mais influence du sens du balayage, bonne robustesse par rapport à l'auto fluorescence | Amélioration de la résolution uniquement avec les paramètres locaux |

TABLE 4.1 – Récapitulatif des résultats

On notera que, d'une manière générale, chacune des méthodes permet d'améliorer les résultats par rapport à l'illumination uniforme aussi bien au niveau du contraste qu'au niveau de la résolution. Leurs performances sont diminuées en présence d'un niveau d'auto fluorescence trop important mais elles restent toujours supérieures à celles de l'illumination uniforme.

Au niveau du contraste, l'illumination structurée offre les meilleures performances générales dans les cas étudiés, mais des artéfacts peuvent apparaître lorsque le niveau d'auto fluorescence est trop important. La méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation offre elle aussi de très bonnes performances et est plus robuste par rapport à l'auto fluorescence. Les méthodes de détection localisée offrent quant à elles de bons résultats lorsqu'on est proche de

la surface (jusqu'à une profondeur de 5 mm environ).

En termes de résolution, les meilleurs résultats sont obtenus avec la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage et avec la méthode d'illumination structurée. La méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation n'améliore la résolution qu'en utilisant les paramètres locaux, les résultats étant cependant moins intéressants qu'avec les autres méthodes.

Chacune des méthodes a donc ses avantages et ses inconvénients, et nous avons vu qu'il est possible de combiner certaines des méthodes pour améliorer encore certains résultats.

4.7 Validation *in vivo* des méthodes : étude sur petit animal

Après les études en simulation et sur fantômes, nous avons effectué une validation de nos méthodes dans un cas pratique en faisant une étude sur petit animal.

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 3, pour cette validation *in vivo*, nous avons simulé des tumeurs marquées en insérant des capillaires contenant de l'Alexa Fluor 700 selon quatre configurations :

- un capillaire de 2 μM positionné en sous-cutané, simulant un cas simple,
- deux capillaires de 2 et 20 μM positionnés en sous-cutané et séparés de 5 mm, simulant un cas où le haut niveau de signal d'une zone marquée pourrait cacher une zone proche marquée plus faiblement (l'"effet d'écran" précédemment décrit),
- un capillaire de 20 μM positionné au niveau de l'abdomen, simulant un cas de difficulté intermédiaire avec une inclusion en profondeur,
- un capillaire de 20 μM positionné au niveau du thorax, simulant un cas complexe avec une inclusion en profondeur dans une zone très hétérogène optiquement.

Nous allons à présent détailler les résultats obtenus dans ces quatre configurations. Pour chacune d'entre elles, nous présenterons tout d'abord les images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes superposées aux images en lumière blanche afin de faciliter la visualisation de la zone considérée. Nous présenterons ensuite les images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes afin d'avoir une meilleure vision des différences de contraste et de résolution.

4.7.1 Cas simple avec un capillaire en sous-cutané

Cette première configuration de capillaire nous permet de tester l'intérêt de nos méthodes dans un cas simple où l'illumination uniforme offre déjà de bons résultats en termes de contraste et de résolution. La concentration de fluorophore au sein du capillaire inséré dans la souris est de 2 μM .

Sur la figure 4.48, on présente les images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes superposées aux images prises en lumière blanche tandis que les images de fluorescence brutes sont présentées sur la figure 4.49.

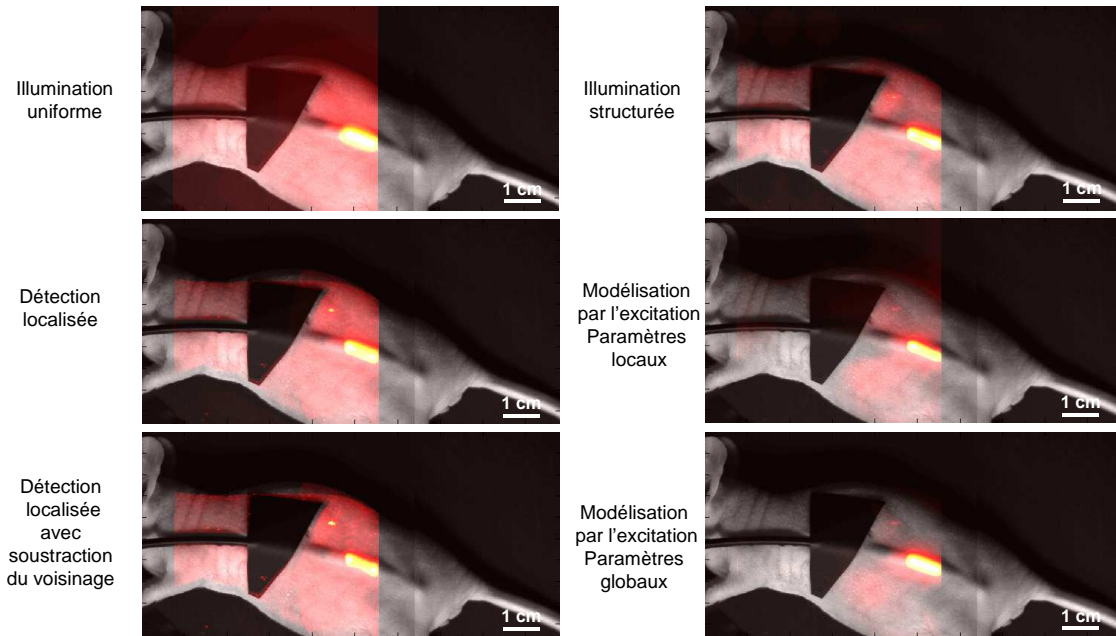


FIGURE 4.48 – Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas d'un capillaire unique positionné en sous-cutané.

On voit bien sur ces images qu'il est possible de détecter de manière nette l'inclusion fluorescente même avec l'illumination uniforme. La diffusion entraîne une perte sensible de la résolution et une augmentation du signal de fond, mais cela n'est pas suffisant pour empêcher la détection du fluorophore au sein du capillaire à cette profondeur proche de la surface. On constate que l'on retrouve les caractéristiques de chacune des méthodes présentées précédemment. Les méthodes de détection localisée et la méthode d'illumination structurée permettent d'avoir la meilleure amélioration de résolution. La méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation offre quant à elle la meilleure amélioration de contraste en réduisant fortement le signal de fond, notamment avec les paramètres globaux.

Sur la figure 4.49, on remarque en détection localisée avec soustraction du voisinage que l'intensité de fluorescence n'est pas homogène au sein du capillaire, le signal étant plus intense aux extrémités de la zone contenant le fluorophore (ceci est aussi visible en illumination structurée pour des hautes fréquences lorsque la profondeur des photons considérés est faible). Après vérification, la répartition du fluorophore n'était effectivement pas homogène au sein du capillaire. L'amélioration de résolution apportée par la détection localisée avec soustraction du voisinage nous a donc permis de distinguer cette inhomogénéité de répartition du fluorophore qui n'était pas visible en illumination uniforme à cause de la diffusion.

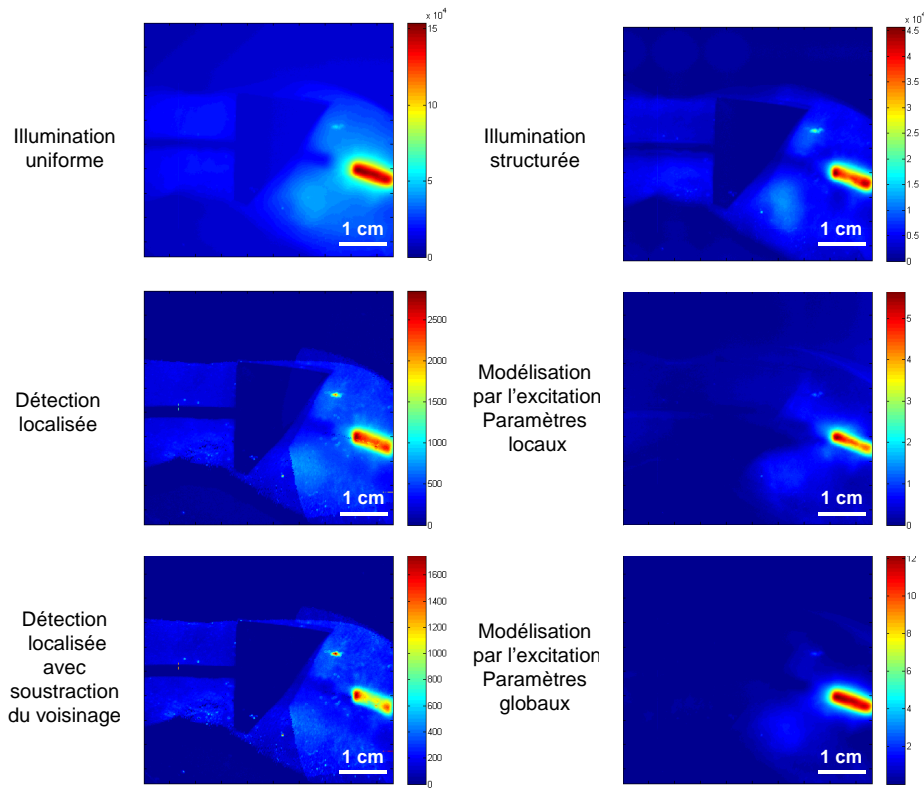


FIGURE 4.49 – Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas d’un capillaire unique positionné en sous-cutané.

4.7.2 Cas avec deux capillaires en sous-cutané à deux concentrations différentes : “effet d’écran”

Cette deuxième configuration de capillaires nous permet de tester l’intérêt de nos méthodes dans un cas réel où la diffusion d’un fort signal de fluorescence nous empêcherait de distinguer un signal de fluorescence proche et d’intensité plus faible. La concentration de fluorophore au sein des capillaires insérés dans la souris est de $2\ \mu\text{M}$ et $20\ \mu\text{M}$, les deux capillaires étant séparés d’environ 5 mm.

Sur la figure 4.50, on présente les images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes superposées aux images prises en lumière blanche tandis que les images de fluorescence brutes sont présentées sur la figure 4.51.

En illumination uniforme, on voit que l’on détecte très bien l’inclusion à $20\ \mu\text{M}$, mais il est impossible de distinguer l’inclusion à $2\ \mu\text{M}$ à cause de la diffusion : on ne fait pas la différence entre le signal au niveau du capillaire et le signal de fond. L’amélioration au niveau du contraste est comparable pour chacune des méthodes. Concernant la résolution, comme dans le cas précédent où il n’y avait qu’un seul capillaire, ce sont les méthodes de détection localisée et la méthode d’illumination structurée qui permettent d’améliorer le mieux la résolution du capillaire à $20\ \mu\text{M}$. Cependant, même avec cette amélioration, il est difficile

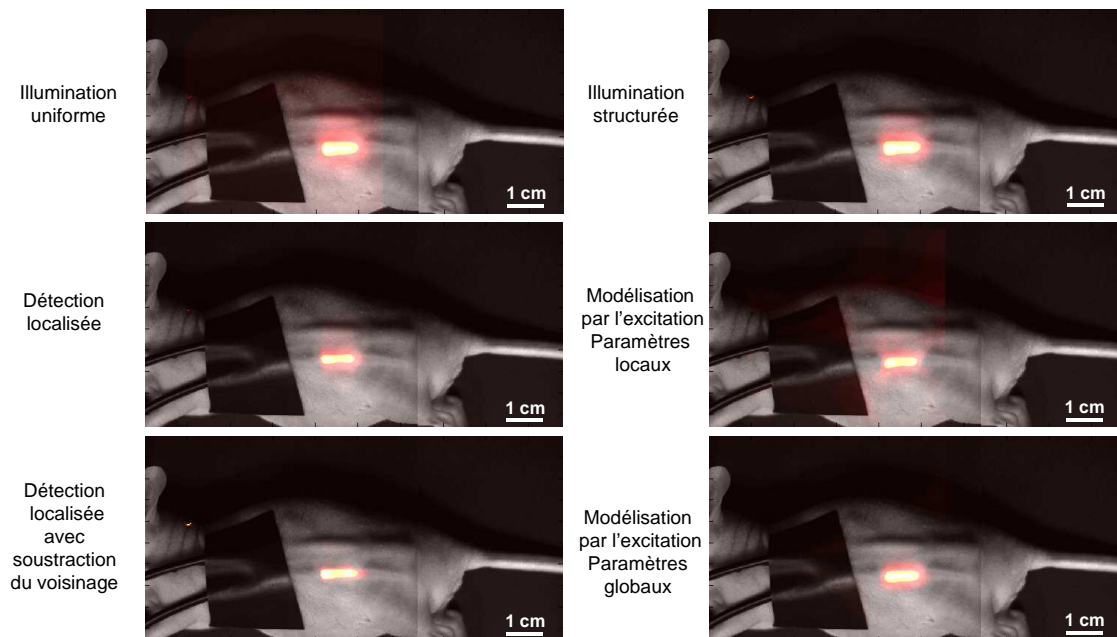


FIGURE 4.50 – Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas de deux capillaires positionnés en sous-cutané à deux concentrations différentes.

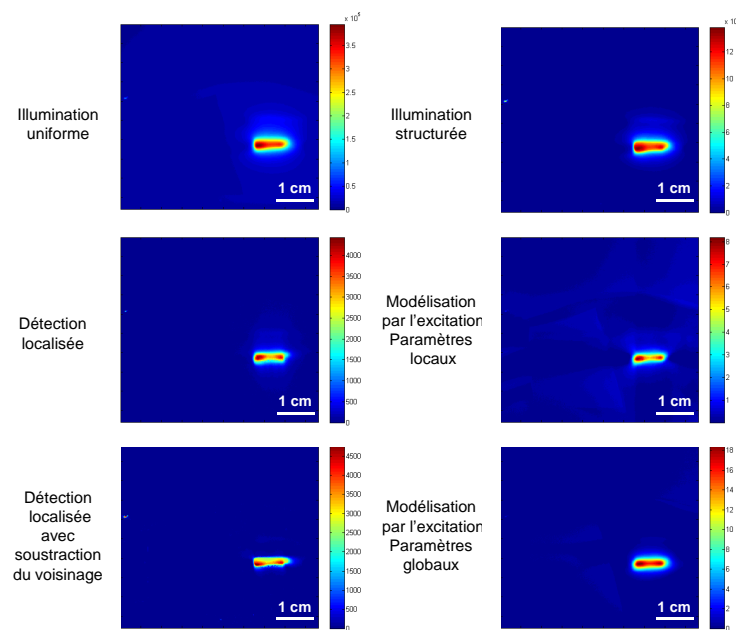


FIGURE 4.51 – Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas de deux capillaires positionnés en sous-cutané à deux concentrations différentes.

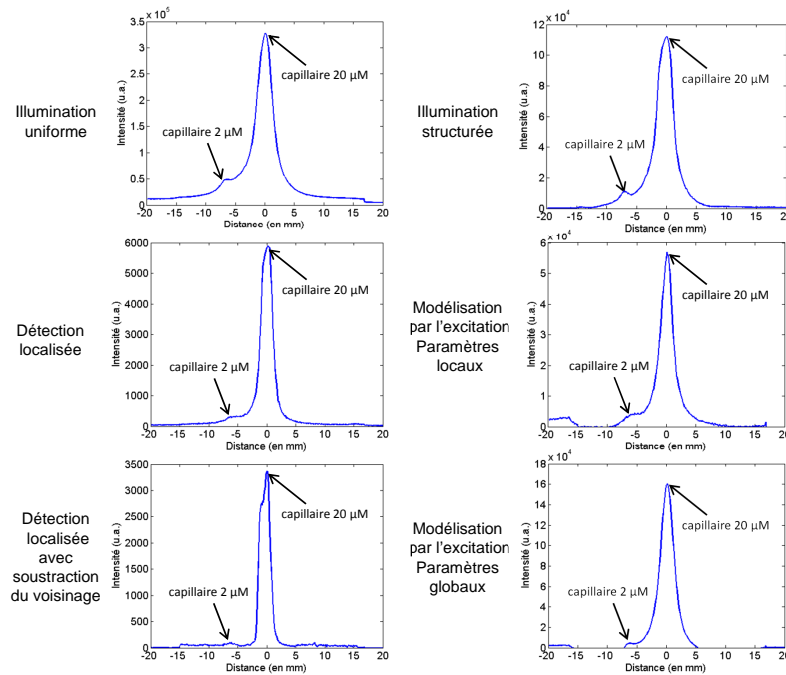


FIGURE 4.52 – Profil d'intensité pris perpendiculairement aux deux capillaires pour chacune des méthodes.

de détecter nettement le capillaire à $2 \mu\text{M}$.

On a tracé sur la figure 4.52 les profils d'intensité pris perpendiculairement aux deux capillaires pour chacune des méthodes.

On voit sur le profil en illumination uniforme que le pic d'intensité du capillaire à $2 \mu\text{M}$ est caché par le signal diffusé du capillaire à $20 \mu\text{M}$. L'amélioration de résolution apportée par la détection localisée simple ne suffit pas à distinguer le capillaire à $2 \mu\text{M}$, seul le pic du capillaire à $20 \mu\text{M}$ est mieux résolu. Les méthodes de modélisation du signal parasite par l'excitation ne permettent pas non plus de détecter le capillaire à $2 \mu\text{M}$. La méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage permet de diminuer fortement le signal diffusé autour des capillaires, mais le niveau du capillaire à $2 \mu\text{M}$ reste tout de même très faible. Seule l'illumination structurée permet de faire ressortir le pic du capillaire à $2 \mu\text{M}$ de manière satisfaisante, et c'est la seule méthode avec laquelle on trouve le facteur 10 auquel on s'attend entre les niveaux des deux capillaires.

4.7.3 Cas intermédiaire avec un capillaire au niveau de l'abdomen

Cette configuration de capillaire nous permet de tester l'intérêt de nos méthodes dans un cas intermédiaire : le fluorophore se trouve à une profondeur d'environ 6 mm, ce qui entraîne une perte de résolution, mais le contraste reste relativement bon. De plus, nous avons utilisé le capillaire ayant une concentration de fluorophore $20 \mu\text{M}$.

Sur la figure 4.53, on présente les images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes superposées aux images prises en lumière blanche tandis que les images de fluorescence brutes sont présentées sur la figure 4.54.

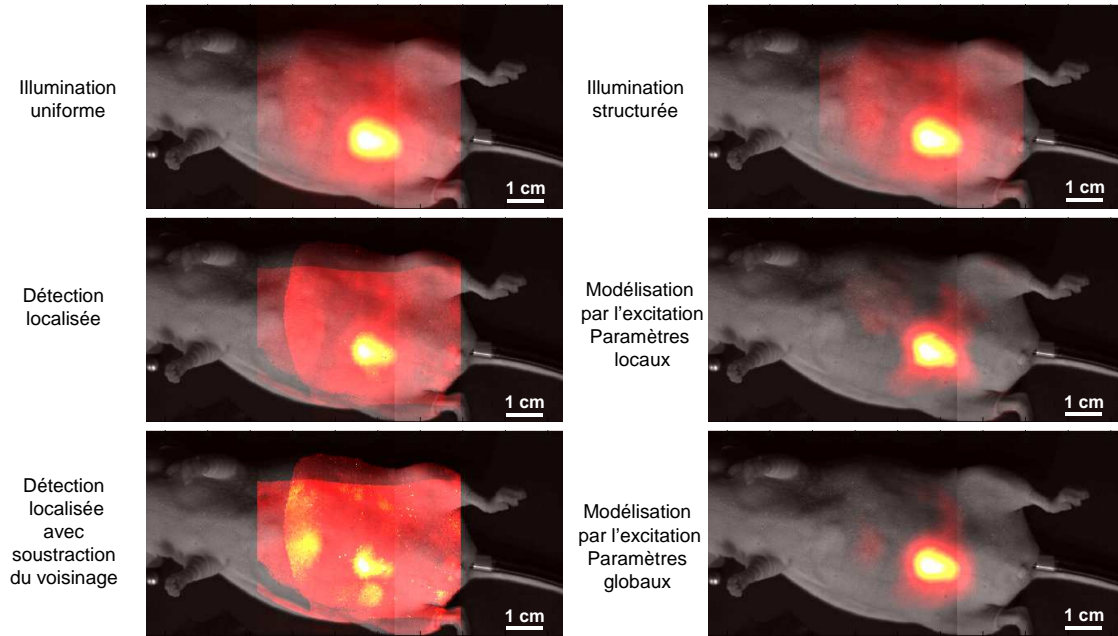


FIGURE 4.53 – Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau de l'abdomen.

Du fait de la concentration importante de fluorophore dans le capillaire, il est possible de détecter correctement l'inclusion fluorescente même en illumination uniforme. On remarque toutefois que le niveau de signal de fond est plus gênant que lors des expériences précédentes en sous-cutané. On remarque aussi que la perte de résolution due à la diffusion est plus importante, la profondeur à laquelle se trouve le capillaire étant plus grande. Comme pour les expériences précédentes, les méthodes ont chacune leurs avantages et inconvénients : les méthodes de détection localisée permettent en effet d'améliorer la résolution mais elles augmentent la sensibilité aux hétérogénéités des couches proches de la surface, diminuant ainsi le contraste dans ce cas réel. La méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation permet de réduire totalement le niveau du signal de fond, mais la résolution reste inchangée. Concernant l'illumination structurée, celle-ci n'apporte pas d'amélioration notable dans ce cas, ce qui peut être dû à la profondeur du capillaire observé.

4.7.4 Cas complexe avec un capillaire au niveau du thorax

Cette dernière configuration de capillaire nous permet de tester l'intérêt de nos méthodes dans un cas complexe : comme dans le cas précédent, le capillaire est localisé à une profondeur d'environ 6 mm, mais il se trouve cette fois-ci au niveau du thorax qui est une zone beaucoup plus hétérogène du point de vue optique. Cette forte hétérogénéité optique rend très difficile

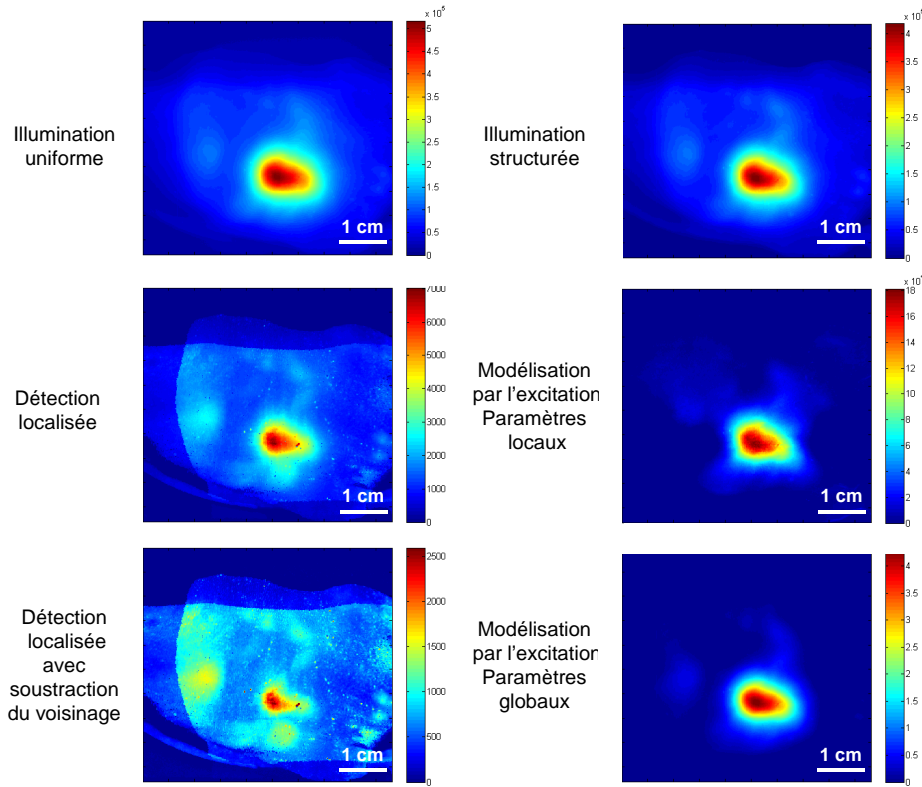


FIGURE 4.54 – Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau de l'abdomen.

l'acquisition de signaux de fluorescence avec les techniques d'imagerie classique utilisant une illumination uniforme^[111]. La concentration de fluorophore au sein du capillaire inséré dans la souris est de $20 \mu\text{M}$.

Sur la figure 4.55, on présente les images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes superposées aux images prises en lumière blanche tandis que les images de fluorescence brutes sont présentées sur la figure 4.56.

En illumination uniforme, on voit qu'il est impossible de distinguer le signal de fluorescence provenant du capillaire. Le niveau de signal de la zone fluorescente qui se trouve au niveau du capillaire est en effet comparable au niveau de signal du reste de la région illuminée. Ce signal de fond est une somme de l'auto fluorescence de la souris et du signal d'excitation qui n'était pas complètement filtré. Le haut niveau de signal du fond est dû au temps d'intégration relativement long (2 secondes) utilisé pour faire l'acquisition des images pour cette expérience.

L'illumination structurée n'apporte rien dans ce cas : l'inclusion est en profondeur et ce sont les couches supérieures qui viennent occulter le signal de l'inclusion. La méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation n'apporte pas non plus d'amélioration dans ce cas. Comme aucun signal de fluorescence ne se distingue par rapport au fond, cette méthode réduit le signal de manière générale sans améliorer la détection, que ce soit avec les paramètres locaux ou bien avec les paramètres globaux. Les résultats en détection localisée présentés sur

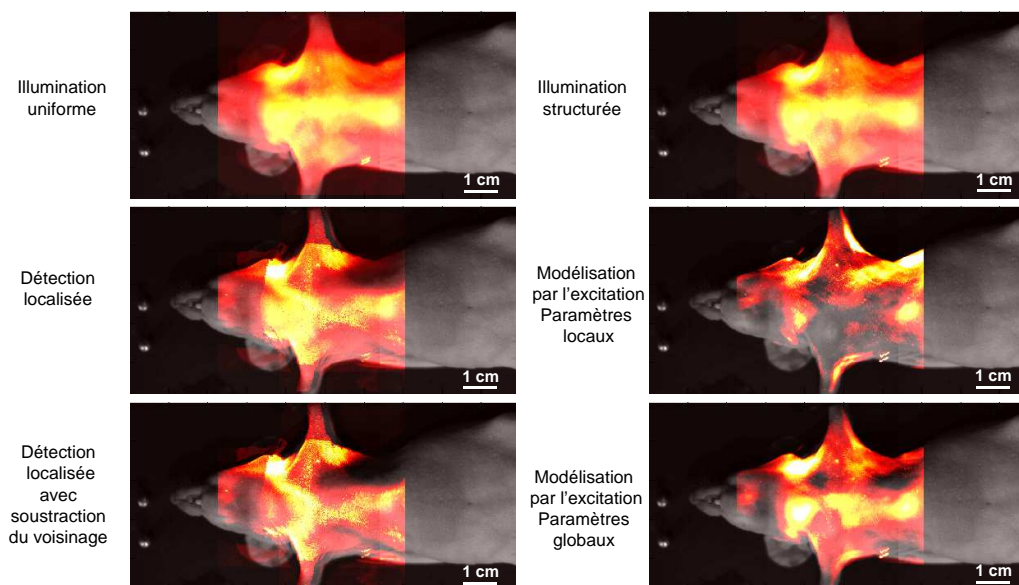


FIGURE 4.55 – Superposition des images de fluorescence obtenues avec les différentes méthodes sur les images en lumière blanche dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau du thorax.

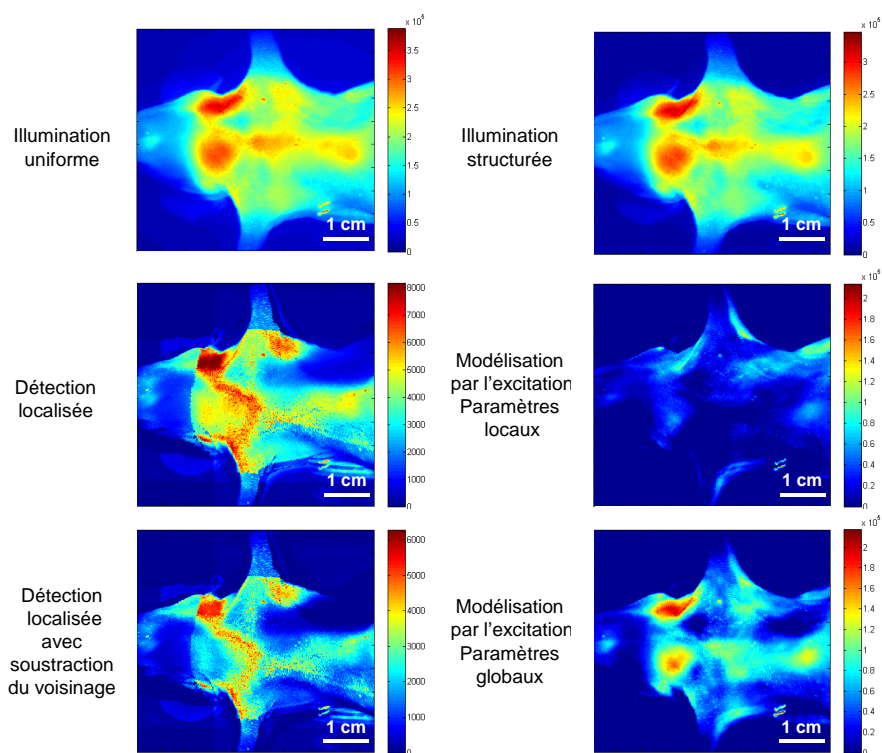


FIGURE 4.56 – Images de fluorescence brutes obtenues avec les différentes méthodes dans le cas d'un capillaire unique positionné au niveau du thorax.

cette figure ont été obtenus avec des paramètres de base (détection sur l'excitation en détection localisée simple et taille de voisinage de 1 mm pour la détection localisée avec soustraction du voisinage). Ces méthodes n'améliorent pas les résultats par rapport à l'illumination uniforme dans ce cas, les paramètres utilisés étant plutôt adaptés aux profondeurs proches de la surface.

Nous avons cependant procédé à une optimisation des paramètres utilisés en détection localisée pour tenter d'améliorer les résultats. Du fait du faible ratio de signal de fluorescence par rapport au signal de fond, la méthode de détection localisée simple était plus adaptée que la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage. Nous avons donc étudié les résultats obtenus avec dix écarts sources-détecteurs compris entre 1 et 10 mm pour sélectionner le meilleur d'entre eux qui a été obtenu pour un écart de 8 mm. Pour obtenir un champ imagé comparable à celui de l'illumination uniforme, nous avons sommé les images en détection localisée simple obtenues en prenant les écarts sources-détecteurs dans les deux directions.

Sur la figure 4.57.a, nous avons représenté l'image en lumière blanche de la souris pour avoir une information sur la localisation transversale de la fluorescence d'intérêt.

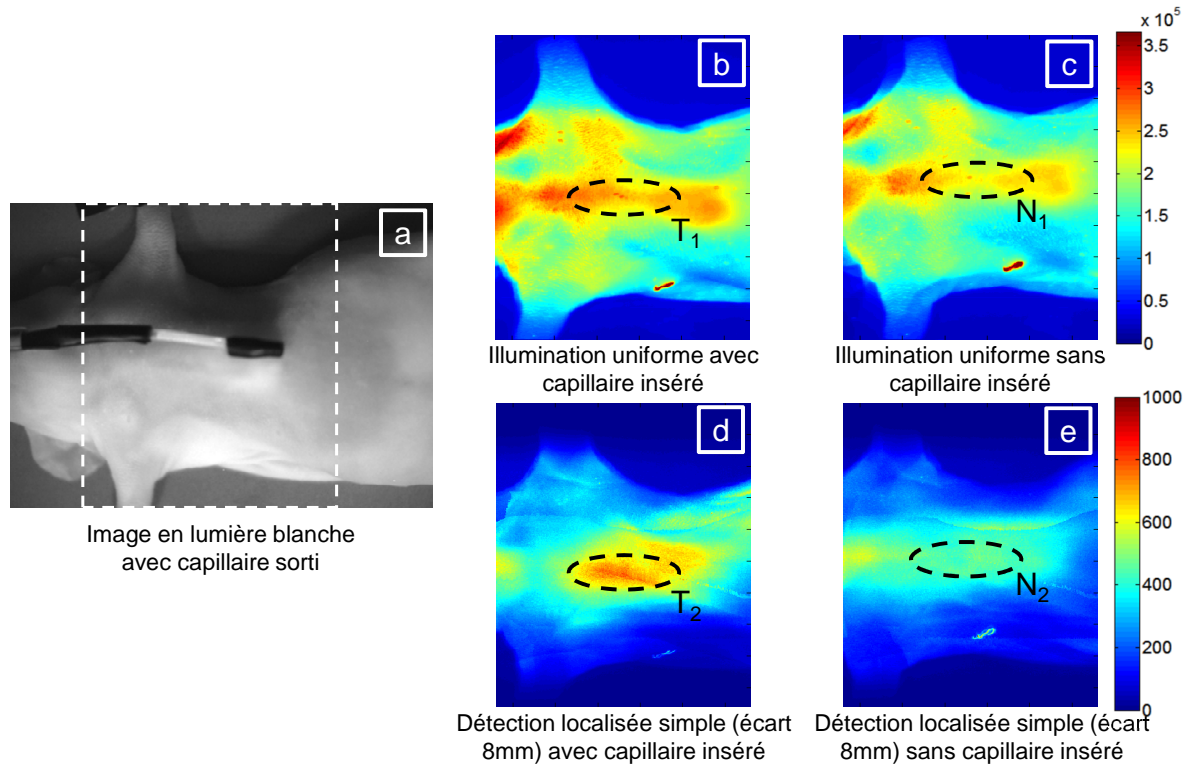


FIGURE 4.57 – (a) : Image en lumière blanche avec le capillaire sorti pour montrer la localisation de la fluorescence d'intérêt; (b) : image en illumination uniforme avec le capillaire; (c) : image témoin en illumination uniforme sans le capillaire; (d) : image en détection localisée simple avec un écart sources-détecteurs de 8 mm avec le capillaire; (e) : image témoin en détection localisée simple avec un écart sources-détecteurs de 8 mm sans le capillaire.

Les figures 4.57.b et 4.57.c montrent les images obtenues en illumination uniforme avec et

sans capillaire inséré. Comme nous le disions dans le paragraphe précédent, même si un signal de fluorescence est présent là où devrait se trouver le capillaire, il est perdu dans le signal de fond environnant. On voit de plus que les signaux sont comparables à ceux que l'on a sur l'image témoin. Le contraste obtenu en utilisant les régions T_1 et N_1 définies sur les figures est d'environ 0,07.

Les figures 4.57.d et 4.57.e montrent quant à elles les images obtenues en détection localisée simple avec un écart sources-détecteurs de 8 mm avec et sans capillaire inséré. On voit dans ce cas que l'on distingue une zone fluorescente là où devrait se trouver le capillaire, cette zone fluorescente étant absente sur l'image témoin. Le contraste obtenu en utilisant les régions T_2 et N_2 définies sur les figures est alors d'environ 0,24, soit un contraste plus de trois fois supérieur à celui observé en illumination uniforme. Ceci est rendu possible par la sélection des photons dont la profondeur moyenne correspond à la profondeur de l'inclusion.

4.7.5 Variation de la profondeur considérée dans un cas pratique

Comme nous l'avons expliqué précédemment, certaines de nos méthodes nous offrent la possibilité de considérer plus particulièrement les photons ayant atteint certaines profondeurs. Ceci peut se faire en détection localisée simple en choisissant un écart sources-détecteurs adapté et en illumination structurée en faisant varier la fréquence spatiale.

Nous allons dans cette section présenter une application pratique de cette sélection de la profondeur afin d'en montrer l'intérêt. Les résultats présentés ici sont issus d'une expérience *in vivo* antérieure à celle décrite jusqu'à présent. Lors de cette expérience, nous avons inséré un capillaire dans la souris au niveau de l'abdomen de la même manière que dans le cas décrit dans la partie 4.7.3. Toutefois, la concentration de fluorophore utilisée était dix fois plus faible (2 μM) et le filtrage n'était pas optimisé. Le signal de fond était donc beaucoup plus gênant. Sur la figure 4.58, on présente l'image obtenue en illumination uniforme pour cette expérience.

On voit que, dans ce cas, on peut distinguer deux zones fluorescentes au niveau de l'endroit où devrait se trouver le capillaire (notées 1 et 2, le fort signal de fluorescence à gauche de l'image au niveau de l'anus noté 3 est dû au régime alimentaire de la souris). La zone de fluorescence située à gauche (notée 1) provient du capillaire, et nous avons émis l'hypothèse que la deuxième zone fluorescente à droite (notée 2) pourrait être due aux aliments ingérés par la souris qui se trouveraient dans son intestin. Cette zone serait donc localisée plus en profondeur que le capillaire contenant le fluorophore. Les résultats que nous allons présenter tendent à confirmer cette hypothèse.

Sur la figure 4.59, on présente les images obtenues en illumination structurée pour dix fréquences spatiales différentes comprises entre 0,03 mm^{-1} et 0,3 mm^{-1} .

En augmentant la fréquence spatiale, on va être sensible aux couches de plus en plus proches de la surface. On voit sur ces images que, lorsqu'on utilise des fréquences spatiales plus grandes, le signal de la zone fluorescente à droite va s'estomper puis disparaître complètement pour une fréquence de 0,15 mm^{-1} (le signal fluorescent restant est dû aux artefacts de balayage). Si l'on continue d'augmenter la fréquence spatiale, la zone de fluorescence d'intérêt due au

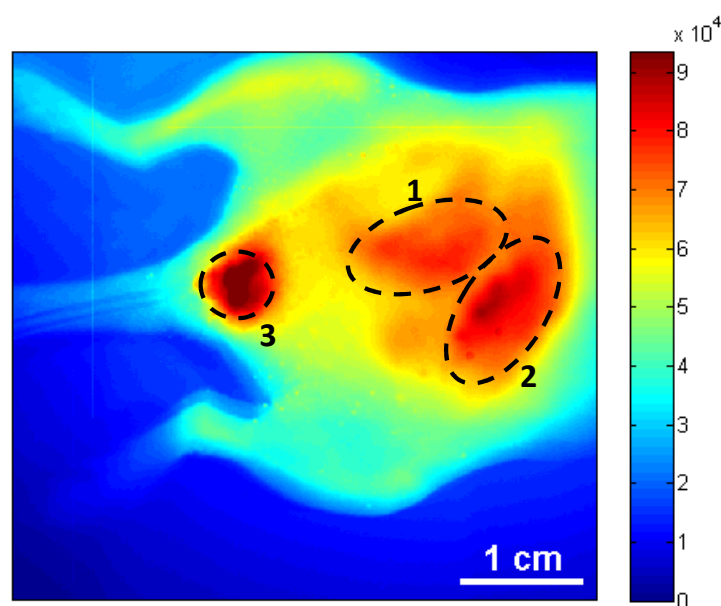


FIGURE 4.58 – Image obtenue en illumination uniforme avec un capillaire inséré au niveau de l'abdomen.

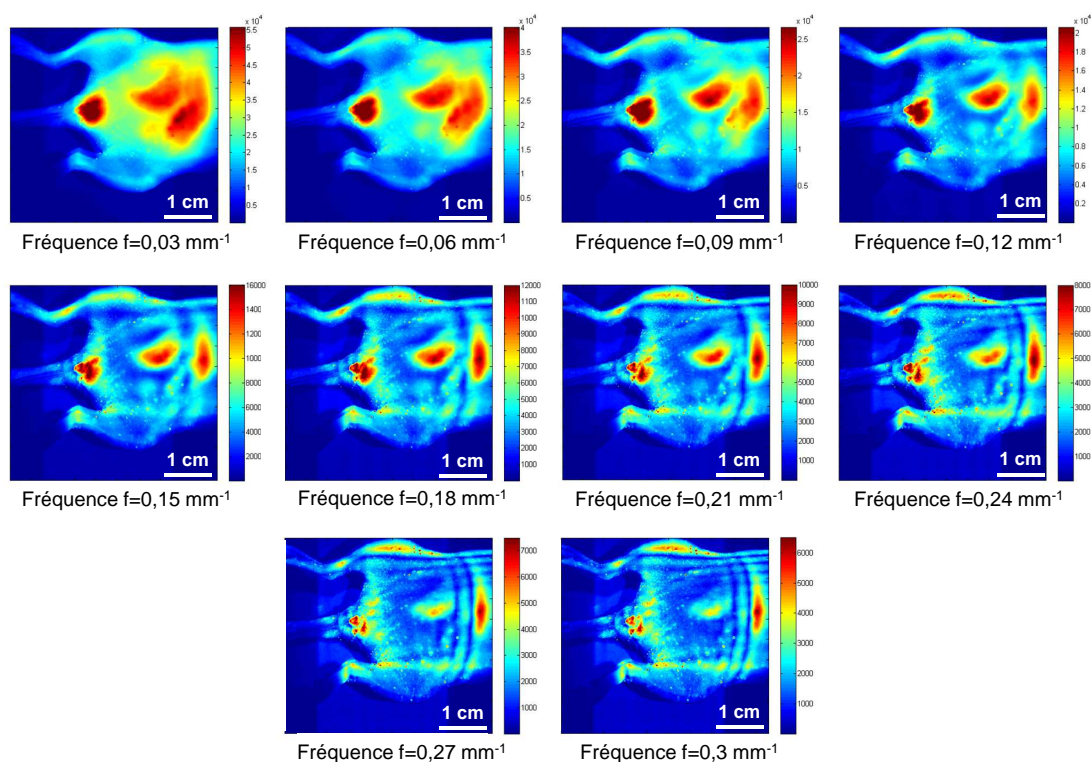


FIGURE 4.59 – Variation de la profondeur sondée en modifiant la fréquence spatiale de l'illumination structurée dans un cas *in vivo*.

capillaire va elle aussi finir par s'estomper.

La figure 4.60 présente quant à elle les images obtenues en détection localisée simple pour dix écarts sources-détecteurs compris entre 1 et 10 mm.

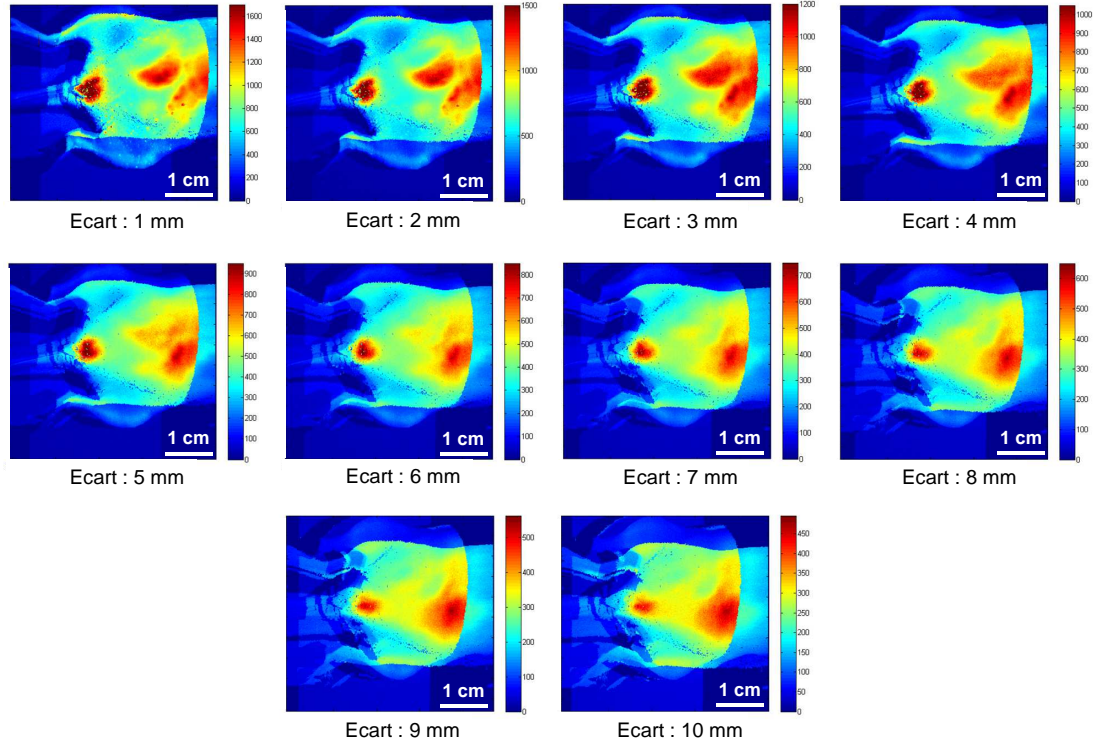


FIGURE 4.60 – Variation de la profondeur sondée en modifiant l'écart sources-détecteurs en détection localisée simple dans un cas *in vivo*.

Avec cette technique on va être capable d'augmenter la sensibilité en profondeur en augmentant la distance entre la ligne d'excitation et la ligne de détection. On voit qu'en augmentant l'écart sources-détecteurs la zone de fluorescence d'intérêt due au capillaire va s'estomper, celle-ci disparaissant totalement à partir d'un écart de 6 mm. La zone de fluorescence qui serait due à l'intestin est quant à elle de plus en plus visible lorsqu'on augmente l'écart sources-détecteurs.

On voit donc dans ce cas un exemple de l'intérêt de nos méthodes. En illumination uniforme, on distingue deux zones fluorescentes produisant des signaux comparables. Il serait impossible de faire une distinction entre elles avec ce type d'illumination. Cependant, avec nos méthodes, il est possible de sélectionner la profondeur à laquelle nous allons majoritairement être sensible afin de trouver des différences entre les deux régions et donc de détecter préférentiellement l'une ou l'autre des deux zones.

4.7.6 Conclusions sur ces résultats *in vivo*

Les résultats présentés dans cette section nous ont permis de valider nos méthodes dans quatre cas concrets de difficulté croissante.

Même dans des cas simples comme en sous-cutané où l'illumination uniforme offre des résultats satisfaisants, on a pu voir que nos méthodes présentent un intérêt en retirant totalement le signal de fond ou en supprimant les effets de la diffusion afin d'avoir une meilleure résolution et donc une meilleure visualisation de la forme des cibles étudiées.

Concernant l'«effet d'écran», on a vu qu'il était possible de corriger ce problème dans une certaine mesure, même si les résultats obtenus sont moins bons que ce que nous avons vu sur fantôme précédemment.

Pour le cas intermédiaire de l'abdomen, il est là aussi possible d'améliorer fortement le contraste en réduisant presque totalement la contribution du signal de fond. On peut aussi améliorer la résolution du capillaire fluorescent au détriment toutefois du contraste.

Pour le cas le plus compliqué du thorax, on a vu que les méthodes d'illumination structurée et de modélisation du signal parasite par l'excitation atteignaient leurs limites. La profondeur est en effet relativement importante et les couches supérieures sont très hétérogènes optiquement. Le signal de fluorescence d'intérêt est alors trop faible par rapport au fond pour le détecter convenablement. Avec la méthode de détection localisée simple, il est cependant possible de choisir une distance entre l'excitation et la détection qui permet d'être plus sensible aux photons dont la profondeur moyenne correspond à la profondeur du capillaire. On augmente alors le signal de fluorescence d'intérêt par rapport au signal de fond qui est réduit. On obtient donc des résultats qui sont habituellement impossibles à avoir avec un système d'imagerie utilisant une illumination uniforme classique.

Enfin, nous avons vu l'intérêt de la sensibilité à la profondeur dans le cas de l'expérience au niveau de l'abdomen avec un filtrage non adapté. Dans ce cas, l'illumination uniforme détectait deux zones fluorescentes d'intensités comparables. En changeant les paramètres de l'illumination structurée et de la détection localisée simple, on peut modifier leur sensibilité à la profondeur et ainsi avoir plus d'informations. Il est alors possible de détecter préférentiellement l'une ou l'autre des deux zones de fluorescence afin de les discriminer.

Ces expériences *in vivo* nous ont aussi permis d'être confrontés aux difficultés de mise en oeuvre de nos méthodes dans des cas réels. Pour les expériences sur fantôme, le milieu observé était statique et plan, les traitements mis en place pour utiliser nos méthodes étaient donc simples puisque la position et la forme de la ligne étaient connues à chaque position d'excitation. En *in vivo*, la respiration de la souris entraînait des mouvements non contrôlés et ses contours ont changé la forme de la ligne d'excitation. Les traitements mis en place ont donc été plus longs et compliqués. De plus, les images de fluorescence et d'excitation ayant été prises à des moments différents, la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation souffre d'un léger biais puisque les lignes d'excitation utilisées ont subi un décalage par rapport aux lignes de fluorescence modélisées. Il nous faudra donc réfléchir à comment contourner ces obstacles pour une future implémentation de nos méthodes.

Toutefois, en l'état et malgré ces difficultés, on remarque que chacune de nos méthodes offre un gain non négligeable par rapport à l'illumination uniforme classique.

Nous n'avons pas présenté ici les résultats obtenus en combinant les méthodes comme nous l'avons fait pour les expériences sur fantôme. En effet, comme nous l'expliquions, les images de fluorescence et les images d'excitation ont été prises séparément, il peut exister un décalage entre la forme de la ligne d'excitation et celle de fluorescence. La mise en oeuvre de la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation est donc moins contrôlée, les résultats obtenus en combinant cette méthode avec l'illumination structurée ou la détection localisée étaient donc moins bons.

4.8 Correction des hétérogénéités d'absorption

Dans cette dernière section, nous allons présenter des résultats préliminaires obtenus avec la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation qui tendent à prouver que cette technique permet aussi de corriger partiellement les effets néfastes causés par la présence d'hétérogénéités d'absorption.

4.8.0.1 Difficultés rencontrées en illumination uniforme

Comme nous l'expliquions dans le premier chapitre, les hétérogénéités d'absorption peuvent être considérées comme des effets parasites puisqu'elles peuvent entraîner des sous-estimations de la fluorescence d'intérêt.

La figure 4.61 illustre ce point à partir de la comparaison entre deux images obtenues avec un fantôme ayant les mêmes propriétés optiques globales mais avec des capillaires dans deux configurations différentes.

Pour le témoin, les deux capillaires possèdent la même concentration de fluorophore dilué dans une solution ayant les mêmes propriétés optiques que le fantôme ($\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_a = 0,05 \text{ cm}^{-1}$). Dans l'autre configuration, les deux capillaires contiennent encore la même concentration de fluorophore mais, pour l'un des deux, la solution dans laquelle le fluorophore est dilué a cette fois un coefficient d'absorption dix fois plus important ($\mu_a = 0,5 \text{ cm}^{-1}$).

On voit alors bien le problème que peuvent poser les hétérogénéités d'absorption puisque le capillaire avec une absorption plus importante génère un signal environ deux fois plus faible que l'autre malgré la présence de la même concentration de fluorophore.

Pour pallier ce problème, une méthode possible est de faire le ratio de l'image de fluorescence par l'image d'excitation^[33]. En effet, l'information sur les différences d'absorption est aussi contenue dans le signal d'excitation (en considérant toutefois que les différences dues aux longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence sont négligeables). Nous avons essayé d'appliquer notre méthode de modélisation du signal par l'excitation afin de voir si elle peut être plus intéressante que le simple ratio des signaux.

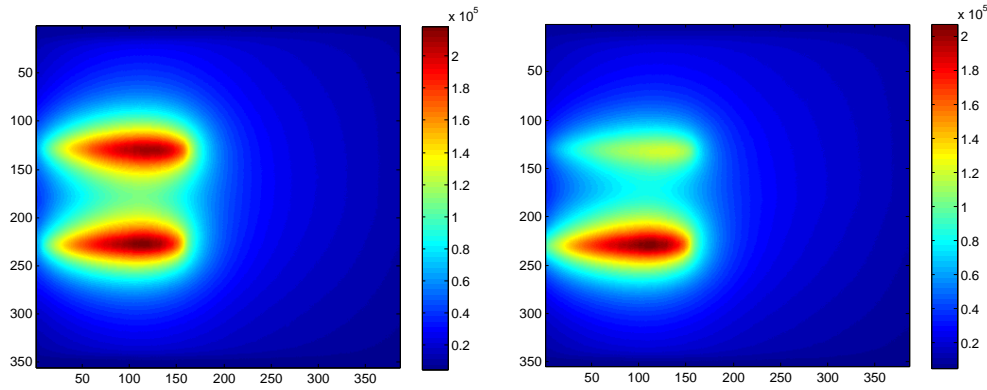


FIGURE 4.61 – Exemple d'effet parasite dû à l'absorption en illumination uniforme : à gauche : témoin, les 2 capillaires contiennent la même concentration de fluorophore et ont le même coefficient d'absorption ; à droite : les 2 capillaires contiennent la même concentration de fluorophore mais le capillaire du haut à un coefficient d'absorption 10 fois plus grand.

4.8.0.2 Etude en simulation

Nous avons tout d'abord appliqué notre méthode en simulation avec le logiciel NIRFAST.

Le premier cas étudié (figure 4.62) est similaire à celui présenté dans le chapitre 2 du point de vue de l'inclusion, la différence venant de l'hétérogénéité absorbante présente au dessus de l'inclusion et venant fausser la détection en illumination uniforme.

Comme dans le cas précédent, le profil obtenu en utilisant les paramètres locaux est proche du profil de fluorescence brut alors que le profil obtenu avec les paramètres globaux n'est sensible qu'à la variation d'absorption. Après soustraction des profils, on retrouve le fait que l'autofluorescence est supprimée avec les deux méthodes, la même remarque pouvant être faite au sujet de la dynamique et des effets de bord pour la méthode avec les paramètres globaux. On remarque aussi que les deux méthodes ont en plus permis de supprimer le creux de fluorescence observé dû à l'hétérogénéité absorbante (le niveau de fluorescence d'intérêt étant toutefois inférieur à celui de la simulation sans absorption au dessus de l'inclusion).

Le deuxième cas de figure étudié est un cas complexe avec deux inclusions fluorescentes proches afin de savoir si cette technique nous permet d'améliorer la résolution par rapport à l'illumination uniforme. Le fantôme étudié ainsi que les profils d'intensité normalisée sont visibles sur la figure 4.63.

Deux simulations ont été faites : la première où les deux inclusions fluorescentes ont les mêmes coefficients d'absorption que le fond, et la deuxième où l'une des inclusions a un coefficient d'absorption dix fois supérieur. On remarque que, pour les deux simulations, la modélisation avec les paramètres locaux améliore la résolution, les deux pics étant mieux séparés que dans le cas de l'illumination uniforme.

Cependant, on voit aussi que, contrairement au cas précédent, l'effet de l'absorption n'est

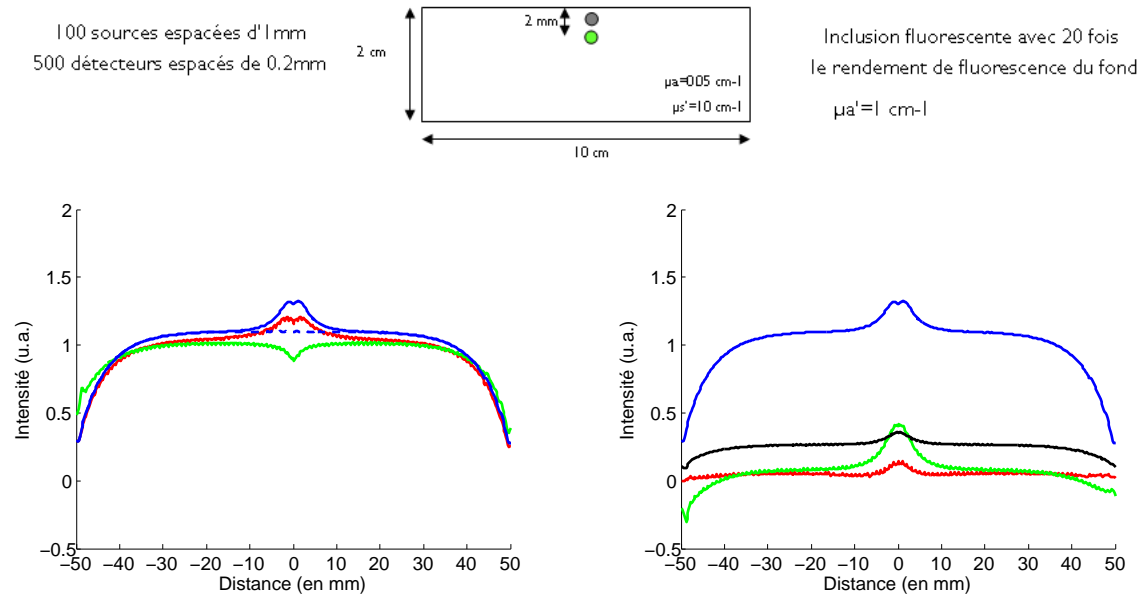


FIGURE 4.62 – Comparaison des profils d'intensité : à gauche : — fluorescence brute F , - - - autofluorescence, — modélisation M_1 de la fluorescence avec les paramètres locaux, — modélisation M_2 de la fluorescence avec les paramètres globaux; à droite : — F , — $F - M_1$, — $F - M_2$.

pas complètement compensé : que ce soit avec la modélisation par l'excitation ou avec la technique du ratio, le signal de fluorescence du capillaire ayant une absorption plus importante est légèrement rehaussé mais ne retrouve pas son niveau de base. Avec les deux techniques, la compensation de l'absorption est donc comparable.

On retrouve aussi le fait que la technique de modélisation avec les paramètres globaux et la technique du ratio n'améliore pas la résolution.

4.8.0.3 Vérification expérimentale

Après ces simulations, nous avons essayé d'appliquer notre méthode expérimentalement pour voir si l'on retrouve les mêmes possibilités sur des mesures réelles. Pour ce faire, nous avons étudié un fantôme dans la même configuration qu'en simulation avec inclusions fluorescentes proches (la seule différence avec le fantôme de la simulation concerne la distance inter-capillaires : dans notre expérience ils sont espacés d'un centimètre). Tout comme en simulation, deux configurations ont été observées : la première où les deux inclusions fluorescentes ont les mêmes coefficients d'absorption que le fond, et la deuxième où l'une des inclusions a un coefficient d'absorption dix fois supérieur. Les images obtenues en illumination uniforme, avec la modélisation par l'excitation et avec le ratio de la fluorescence par l'excitation sont visibles sur la figure 4.64.

On voit nettement sur ces images l'effet de l'absorption plus importante sur le signal du

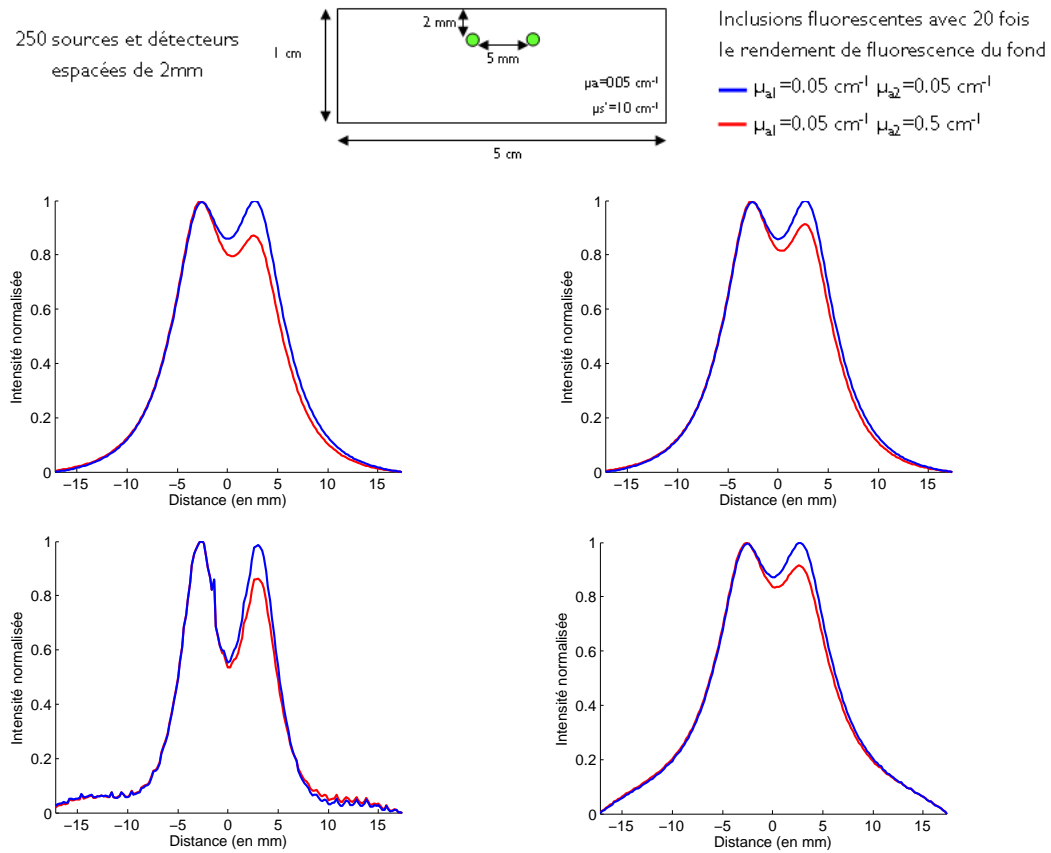


FIGURE 4.63 – Profils normalisés de l'auto fluorescence (en rouge) et de l'excitation (en bleu) à gauche, et ratio de l'auto fluorescence par l'excitation (en bleu) avec sa modélisation (en rouge) à droite.

capillaire supérieur : son intensité est presque deux fois plus faible que celle du capillaire ayant une absorption égale à celle du milieu. Le fait que la diminution d'intensité observée en expérimental soit plus forte que celle observée en simulation peut s'expliquer par l'écartement des capillaires plus important dans la configuration expérimentale : les signaux des capillaires en simulation se superposent plus du fait de leur proximité, ce qui a tendance à diminuer l'effet de l'absorption. A première vue, aucune des techniques ne semble compenser l'effet de l'absorption.

Pour étudier précisément la capacité des techniques à corriger l'effet de l'absorption, nous avons tracé sur les figures 4.65 et 4.66, respectivement les profils d'intensité des différentes méthodes étudiées pris perpendiculairement aux capillaires et les profils d'intensité normalisés.

On voit sur ces figures qu'il existe des différences entre ces résultats expérimentaux et les résultats obtenus en simulation.

Tout d'abord, comme en simulation, on retrouve le fait que la modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux améliore la résolution par rapport à l'illumination uniforme contrairement aux autres techniques. De même, aucune des méthodes ne corrige totalement

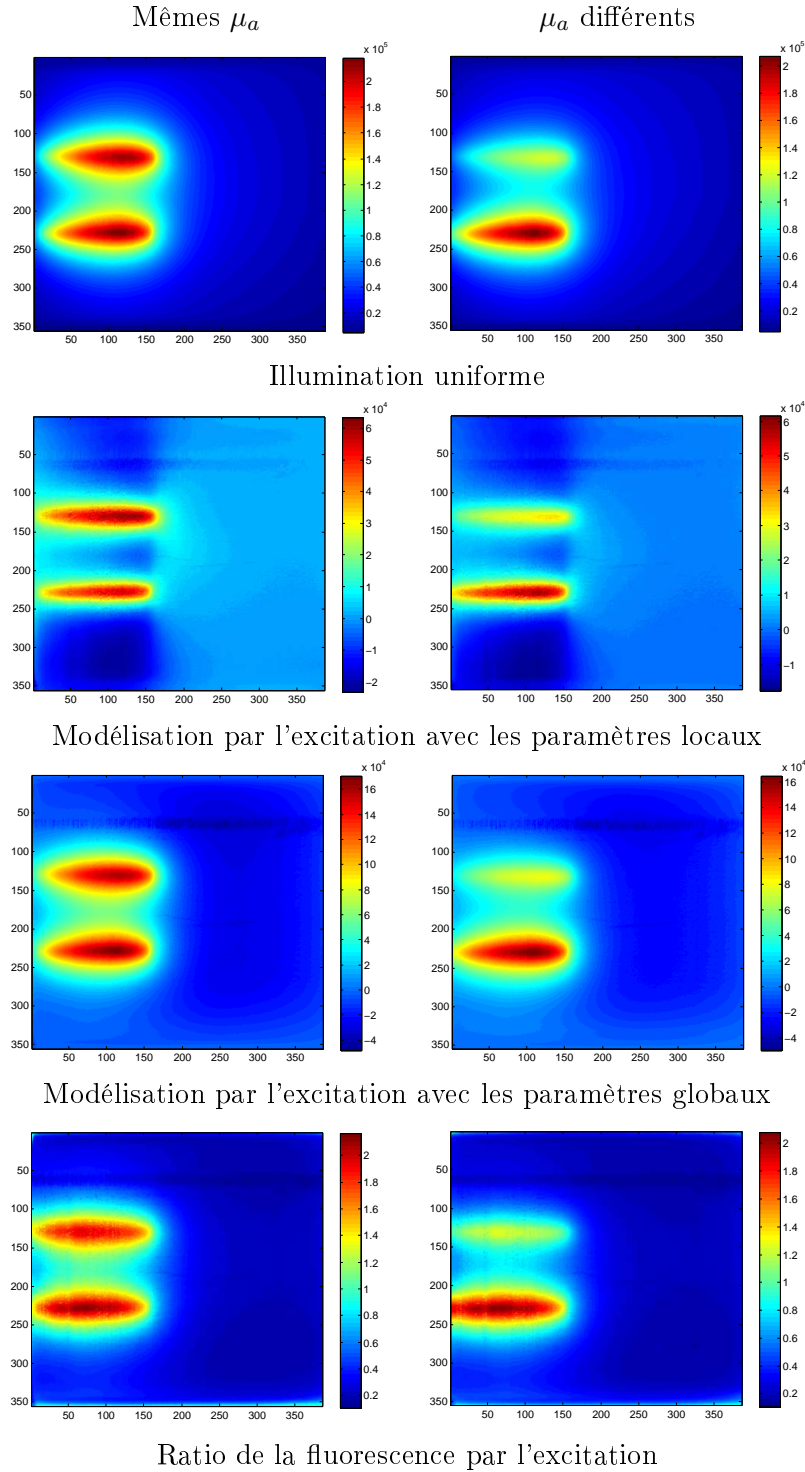


FIGURE 4.64 – Images obtenues avec les différentes méthodes pour deux configurations : à gauche : les deux capillaires ont le même coefficient d'absorption ; à droite : le capillaire supérieur a une absorption dix fois plus importante.

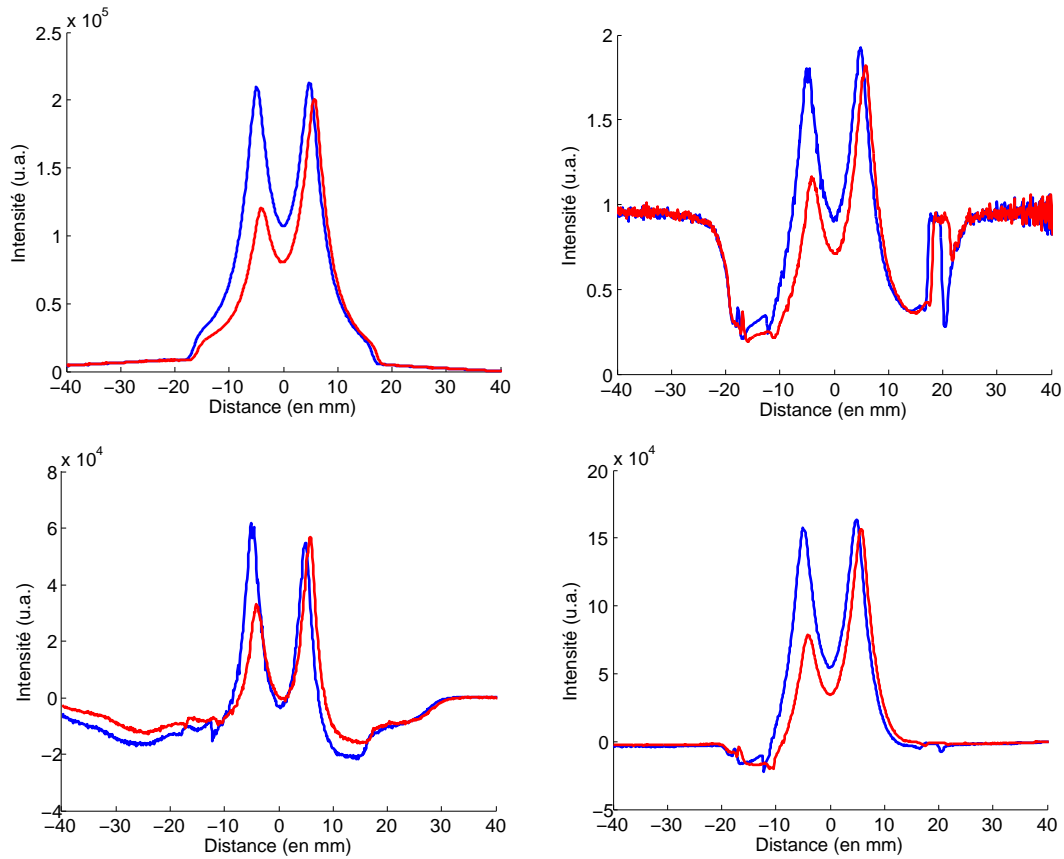


FIGURE 4.65 – Profils d'intensité de fluorescence pour un même coefficient d'absorption (courbes bleues) et pour des coefficients d'absorption avec un facteur 10 (courbes rouges) obtenus en illumination uniforme (en haut à gauche), avec le ratio de la fluorescence par l'excitation (en haut à droite), avec la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres locaux (en bas à gauche) et avec les paramètres globaux (en bas à droite).

l'effet de l'absorption. Cependant, on voit cette fois que seule la modélisation par l'excitation avec les paramètres locaux semble corriger partiellement l'absorption : le signal du capillaire dont l'absorption est plus forte est environ à 63 % de son niveau d'origine, contrairement aux autres techniques où il n'est que de 50 %.

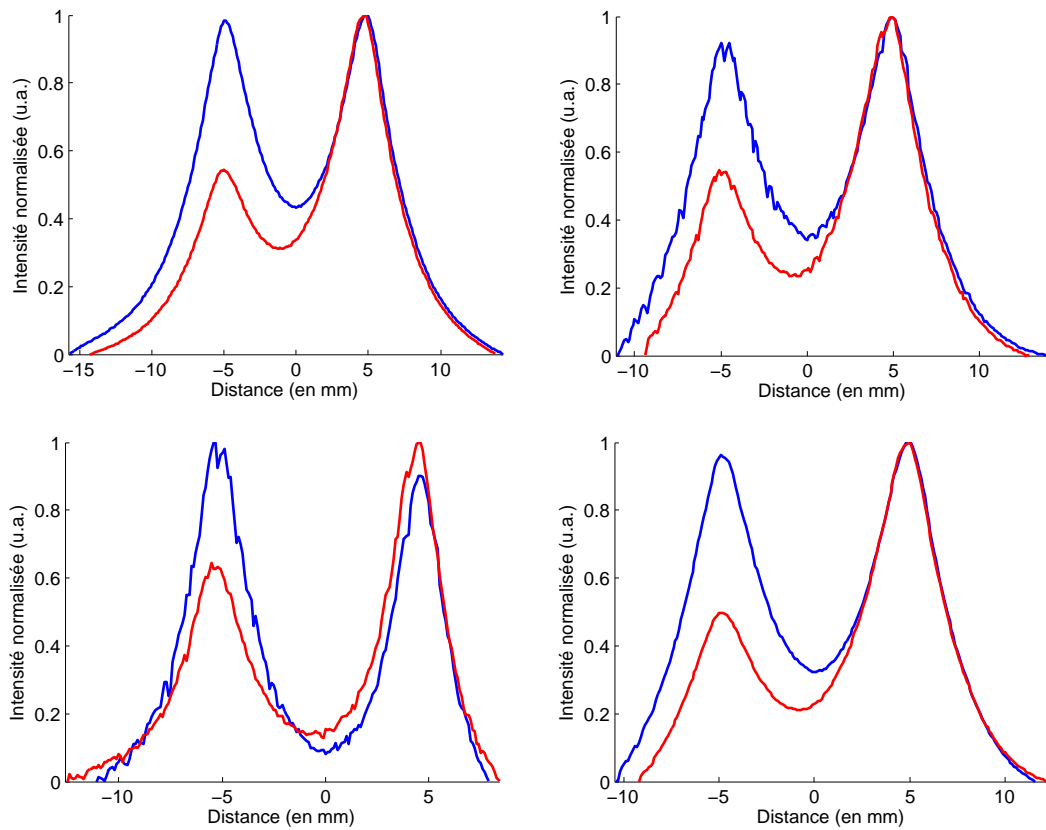


FIGURE 4.66 – Profils d'intensité de fluorescence normalisés pour un même coefficient d'absorption (courbes bleues) et pour des coefficients d'absorption avec un facteur 10 (courbes rouges) obtenus en illumination uniforme (en haut à gauche), avec le ratio de la fluorescence par l'excitation (en haut à droite), avec la méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation avec les paramètres locaux (en bas à gauche) et avec les paramètres globaux (en bas à droite).

Conclusion et perspectives

Afin d'améliorer les signaux obtenus en imagerie moléculaire de fluorescence en rétrodiffusion, nous avons mis en place un dispositif expérimental nous permettant d'utiliser des méthodes innovantes d'illumination et de détection. Ce dispositif consiste à illuminer l'objet d'étude avec une ligne laser qui va balayer le milieu, une image étant acquise à chaque position de la ligne. Nous avons alors développé plusieurs méthodes de traitement des images acquises afin de tirer au mieux parti du contenu informationnel présent dans la pile d'images.

L'état de l'art sur les techniques d'imagerie de fluorescence utilisé dans un environnement peropératoire nous a permis de comprendre les deux principaux points à améliorer, à savoir le contraste entre les objets fluorescents d'intérêt et le fond, et la résolution avec laquelle on va pouvoir définir les objets.

Pour pouvoir améliorer ces deux points, trois axes de recherche ont été suivis pour proposer :

- des techniques de détection localisée,
- une technique d'illumination structurée,
- une technique de modélisation du signal parasite à partir des images prises à la longueur d'onde d'excitation.

Chacune de ces techniques a été étudiée en simulation à partir soit d'un algorithme de Monte Carlo ou bien soit du logiciel NIRFAST mais aussi expérimentalement sur des fantômes optiques. Plusieurs configurations d'inclusions fluorescentes ont été observées afin de comparer les apports de nos différentes méthodes au niveau du contraste et de la résolution.

Les techniques de détection localisée consistent à ne détecter qu'une certaine bande de pixels sur chacune des images afin de reconstituer l'image globale de l'objet. Cette bande de détection peut se situer directement sur la bande d'excitation (on se trouve alors dans un cas comparable à une détection confocale avec une fente virtuelle) mais elle peut aussi être plus éloignée. Nous avons ainsi vu que la distance entre la bande de détection et la bande d'excitation a une influence sur le contraste perçu en fonction de la profondeur de l'inclusion : plus l'inclusion fluorescente est localisée profondément sous la surface, plus il est intéressant de faire une détection éloignée de l'excitation pour augmenter le contraste au maximum.

En plus de la détection localisée simple, nous avons vu qu'il peut être intéressant d'utiliser les bandes de pixels voisines de la bande de détection afin d'avoir un *a priori* sur le niveau de signal à retirer pour diminuer les contributions des signaux parasites. Là aussi nous avons pu constater un lien entre la taille du voisinage considéré et l'évolution du contraste en fonction de la profondeur de l'inclusion observée. On a aussi vu que cette technique était tout particulièrement adaptée pour des objets proches de la surface, l'augmentation de résolution observée est alors très importante.

Concernant l'illumination structurée, nous avons pu voir que nous obtenions des résultats intéressants avec notre méthode de modulation de la pile d'images malgré le fait que nous n'utilisions pas une illumination structurée à proprement parler. En effet, avec notre méthode qui traite les images *a posteriori*, certaines des caractéristiques connues de l'illumination structurée sont retrouvées, notamment son pouvoir de sectionnement optique. Un lien évident a ainsi été constaté entre la fréquence de la modulation de la pile d'images et la profondeur à laquelle le système est sensible aux inclusions fluorescentes.

On a cependant vu qu'il y a quelques contraintes lorsqu'on réalise l'illumination structurée de cette manière. En raison des effets de bord qui apparaissent, il est nécessaire d'acquérir un nombre d'images conséquent sous peine d'avoir une zone d'étude sans artéfacts très réduite.

Pour la technique de modélisation du signal parasite à partir des images d'excitation, nous sommes partis de l'hypothèse qu'il existe un lien entre le signal d'auto fluorescence et le signal d'excitation. En acquérant des images à la longueur d'onde d'excitation en plus de celles à la longueur d'onde de fluorescence, on peut utiliser cette hypothèse pour évaluer le signal d'auto fluorescence à soustraire afin d'augmenter le contraste.

Il est possible d'utiliser les paramètres de modélisation propres à chaque position d'excitation (paramètres locaux) ou bien les paramètres moyens (paramètres globaux) selon le nombre de cibles fluorescentes étudiées. Dans un cas où l'on a peu d'inclusions fluorescentes, il est plus intéressant d'utiliser les paramètres globaux, ceux-ci permettant d'obtenir une représentation correcte de l'auto fluorescence. Mais lorsqu'on a beaucoup de fluorescence d'intérêt, le fait de prendre les paramètres globaux va entraîner une surestimation du signal parasite à soustraire, il est alors plus intéressant d'utiliser les paramètres locaux.

Nous avons aussi vu que cette technique est robuste en présence de variations d'absorption, et même qu'elle permet d'en corriger partiellement les effets.

D'une manière générale, chacune des méthodes permet d'améliorer les résultats par rapport à l'illumination uniforme aussi bien au niveau du contraste qu'au niveau de la résolution. Leurs performances sont diminuées en présence d'un niveau d'auto fluorescence trop important mais elles restent toujours supérieures à celles de l'illumination uniforme.

Au niveau du contraste, l'illumination structurée offre les meilleures performances générales dans les cas étudiés, mais des artéfacts peuvent apparaître lorsque le niveau d'auto fluorescence est trop important. La méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation offre elle aussi de très bonnes performances et est plus robuste par rapport à l'auto fluorescence. Les méthodes de détection localisée offrent quant à elles de bons résultats lorsqu'on est proche de la surface (jusqu'à une profondeur de 5 mm environ).

En termes de résolution, les meilleurs résultats sont obtenus avec la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage et avec la méthode d'illumination structurée. La méthode de modélisation du signal parasite par l'excitation n'améliore la résolution qu'en utilisant les paramètres locaux, les résultats étant cependant moins intéressants qu'avec les autres méthodes.

Chacune des méthodes a donc ses avantages et ses inconvénients, et nous avons aussi vu

qu'il est possible de combiner certaines des méthodes pour améliorer encore certains résultats.

En plus des expériences faites sur fantômes, nous avons aussi réalisé des expériences *in vivo* sur petit animal qui nous ont permis de valider nos méthodes dans quatre cas concrets de difficulté croissante.

Même dans des cas simples comme en sous-cutané ou pour le cas intermédiaire de l'abdomen où l'illumination uniforme offre des résultats satisfaisants, on a pu voir que nos méthodes présentent un intérêt en retirant presque totalement le signal de fond ou en supprimant les effets de la diffusion afin d'avoir une meilleure résolution et donc une meilleure visualisation de la forme des cibles étudiées.

Pour le cas le plus compliqué du thorax, on a vu que les méthodes d'illumination structurée et de modélisation du signal parasite par l'excitation atteignaient leurs limites. La profondeur est en effet relativement importante et les couches supérieures sont très hétérogènes optiquement. Le signal de fluorescence d'intérêt est alors trop faible par rapport au fond pour le détecter convenablement. Avec la méthode de détection localisée simple, il est cependant possible de choisir une distance entre l'excitation et la détection qui permet d'être plus sensible aux photons dont la profondeur moyenne correspond à la profondeur du capillaire. On augmente alors le signal de fluorescence d'intérêt par rapport au signal de fond qui est réduit. On obtient donc des résultats qui sont habituellement impossibles à avoir avec un système d'imagerie utilisant une illumination uniforme classique.

Enfin, nous avons vu l'intérêt de la sensibilité à la profondeur dans le cas de l'expérience au niveau de l'abdomen avec un filtrage non adapté. Dans ce cas, l'illumination uniforme détectait deux zones fluorescentes d'intensités comparables. En changeant les paramètres de l'illumination structurée et de la détection localisée simple, on peut modifier leur sensibilité à la profondeur et ainsi avoir plus d'informations. Il est alors possible de détecter préférentiellement l'une ou l'autre des deux zones de fluorescence afin de les discriminer.

Malgré les difficultés rencontrées au niveau de l'implémentation de nos méthodes pour ces expériences *in vivo*, chacune de nos méthodes offre un gain non négligeable par rapport à l'illumination uniforme classique.

Les perspectives qui s'ouvrent après ces travaux de thèse portent à la fois sur l'optimisation de certaines méthodes et sur leur implémentation en temps réel.

Les méthodes qui pourraient être optimisées sont la détection localisée avec soustraction du voisinage ainsi que la méthode de modélisation du signal d'autofluorescence parasite par l'excitation.

Pour la méthode de détection localisée avec soustraction du voisinage, il serait possible de considérer l'information contenue dans le voisinage de manière plus rigoureuse qu'avec une simple moyenne. L'idée de base de cette méthode est apparue en considérant la variation de l'intensité détectée pour des positions d'excitation voisines. Dans ce cas, l'utilisation de la moyenne est correcte. Nous avons vu que le signal contenu dans les bandes de pixels voisines de la bande d'excitation est suffisamment proche du signal des positions d'excitation voisines pour que l'utilisation de la moyenne offre de bons résultats. Ceci n'a toutefois un sens que

lorsqu'on considère des voisinages inférieurs à une certaine taille.

Pour la méthode de modélisation du signal d'auto fluorescence parasite par l'excitation, il serait intéressant d'utiliser une modélisation plus complexe (qui pourrait par exemple dépendre aussi du carré de la distance r) pour être plus proche du comportement réel de l'auto fluorescence notamment lorsqu'on est proche du maximum d'intensité au niveau de l'excitation. Les capacités de correction des effets des hétérogénéités d'absorption sont aussi une piste intéressante à poursuivre, ces hétérogénéités pouvant être une source non négligeable de distorsion du signal en imagerie de fluorescence.

Concernant l'implémentation des méthodes, jusqu'à présent, celle-ci a été faite en post-traitement sur les piles d'images acquises. L'avantage d'une technique comme la détection localisée est qu'elle pourrait être implémentée en temps réel. Le montage envisagé présenté dans le chapitre 3 s'inspire d'un montage de microscope confocal à scanning bilatéral. En synchronisant la durée d'acquisition d'une image avec la durée de balayage de la zone d'intérêt, cette configuration nous permettrait d'obtenir une image en détection localisée sans réaliser de traitement *a posteriori*. L'implémentation pourrait se faire avec un masque mécanique dans un premier temps, mais nous pourrions aussi utiliser un modulateur spatial de lumière qui permettrait de réaliser plus de traitements. Il serait aussi possible à terme d'imaginer un dispositif portable où ce montage y serait intégré.

Il y aurait toutefois des difficultés de mise en oeuvre à résoudre pour être capable d'imager correctement toute sorte d'objets. Les expériences *in vivo* nous ont permis d'être confrontés à ces difficultés observées dans des cas réels. Pour les expériences sur fantôme, le milieu observé était statique et plan, les traitements mis en place pour utiliser nos méthodes étaient donc simples puisque la position et la forme de la ligne étaient connues à chaque position d'excitation. En *in vivo*, la respiration de la souris entraînait des mouvements non contrôlés et ses contours ont changé la forme de la ligne d'excitation. Il faudrait donc trouver une méthode pour résoudre ces problèmes de forme de ligne pour pouvoir implémenter convenablement nos méthodes.

Une fois l'implémentation faite, il serait alors intéressant d'appliquer nos méthodes dans des cas *in vivo* plus complexes où l'on injecterait par exemple le fluorophore : dans ce cas, nous serions confronté aussi à la fluorescence non spécifique des marqueurs, et nous verrions alors l'intérêt de nos méthodes lorsqu'on est confronté à tous les signaux parasites existant en imagerie de fluorescence.

Enfin, nous pourrions envisager d'appliquer nos méthodes dans d'autres domaines, comme par exemple l'imagerie endogène. Nos méthodes de détection localisée permettraient dans ce cas d'imager les contrastes d'absorption proches de la surface avec une résolution très bonne.

Bibliographie

- [1] F. Leblond, S. C. Davis, P. A. Valdes, and B. W. Pogue, "Preclinical whole-body fluorescence imaging : Review of instruments, methods and applications," *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, vol. 98, pp. 77–94, Jan. 2010.
- [2] L. G. Henyey and J. L. Greenstein, "Diffuse radiation in the galaxy," *Annales d'Astrophysique*, vol. 3, p. 117, Jan. 1940.
- [3] W.-F. Cheong, S. Prahl, and A. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE Journal of Quantum Electronics*, vol. 26, no. 12, pp. 2166–2185, 1990.
- [4] T. Vo-Dinh, *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton, Fla. : CRC Press, 2003.
- [5] V. Tuchin, *Tissue Optics*. 1000 20th Street, Bellingham, WA 98227-0010 USA : SPIE, Sept. 2007.
- [6] G. Alexandrakis, F. R. Rannou, and A. F. Chatziioannou, "Tomographic bioluminescence imaging by use of a combined optical-PET (OPET) system : a computer simulation feasibility study," *Physics in medicine and biology*, vol. 50, pp. 4225–4241, Sept. 2005.
- [7] S. Prahl, *Light Transport in Tissue*. PhD thesis, University of Texas at Austin, 1988.
- [8] A. Ishimaru, "Diffusion of light in turbid material," *Applied optics*, vol. 28, pp. 2210–2215, June 1989.
- [9] A. Ishimaru, "Chapter 2 - scattering and absorption of a wave by a single particle," in *Wave Propagation and Scattering in Random Media*, pp. 9–40, Academic Press, 1978.
- [10] A. Ishimaru, "Diffusion of a pulse in densely distributed scatterers," *Journal of the Optical Society of America (1917-1983)*, vol. 68, p. 1045, Aug. 1978.
- [11] A. Ishimaru, "Theory and application of wave propagation and scattering in random media," *Proceedings of the IEEE*, vol. 65, no. 7, pp. 1030–1061, 1977.
- [12] S. Chandrasekhar, "Stochastic problems in physics and astronomy," *Reviews of Modern Physics*, vol. 15, pp. 1–89, Jan. 1943.
- [13] A. Joshi, J. Rasmussen, S. Kwon, T. Wareing, J. McGhee, and E. Sevick-Muraca, "Multimodality CT-PET-NIR fluorescence tomography," in *5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008*, pp. 1601–1604, 2008.
- [14] A. Kienle, "Light diffusion through a turbid parallelepiped," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 22, pp. 1883–1888, Sept. 2005.
- [15] A. D. Klose and A. H. Hielscher, "Optical tomography using the time-independent equation of radiative transfer—part 2 : inverse model," *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol. 72, pp. 715–732, Mar. 2002.
- [16] A. D. Klose, H. K. Kim, and A. H. Hielscher, "Fluorescence tomography with the frequency domain equation of radiative transfer," in *Biomedical Optics*, OSA Technical Digest (CD), p. BTuF67, Optical Society of America, Mar. 2008.
- [17] A. D. Klose, V. Ntziachristos, and A. H. Hielscher, "The inverse source problem based on the radiative transfer equation in optical molecular imaging," *J. Comput. Phys.*, vol. 202, pp. 323–345, Jan. 2005.

- [18] S. R. Arridge, "Optical tomography in medical imaging," *Inverse Problems*, vol. 15, p. R41, Apr. 1999.
- [19] Y. Bérubé-Lauzière, V. Issa, and J. Bouza Dominguez, "Simplified spherical harmonics approximation of the time-dependent equation of radiative transfer for the forward problem in time-domain diffuse optical tomography," vol. 7174, pp. 717403–717403–11, 2009.
- [20] A. D. Klose and E. W. Larsen, "Light transport in biological tissue based on the simplified spherical harmonics equations," *Journal of Computational Physics*, vol. 220, pp. 441–470, Dec. 2006.
- [21] G. S. Abdoulaev and A. H. Hielscher, "Three-dimensional optical tomography with the equation of radiative transfer," *Journal of Electronic Imaging*, vol. 12, no. 4, pp. 594–601, 2003.
- [22] M. S. Patterson, B. Chance, and B. C. Wilson, "Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties," *Applied Optics*, vol. 28, pp. 2331–2336, June 1989.
- [23] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Dec. 2007.
- [24] R. Graaff, M. H. Koelink, F. F. M. de Mul, W. G. Zijistra, A. C. M. Dassel, and J. G. Aarnoudse, "Condensed monte carlo simulations for the description of light transport," *Applied Optics*, vol. 32, pp. 426–434, Feb. 1993.
- [25] S. A. Prahl, M. Keijzer, S. L. Jacques, and A. J. Welch, "A monte carlo model of light propagation in tissue," in *SPIE Proceedings of Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology*, pp. 102–111, Press, 1989.
- [26] J. V. Frangioni, "In vivo near-infrared fluorescence imaging," *Current opinion in chemical biology*, vol. 7, pp. 626–634, Oct. 2003.
- [27] V. Ntziachristos, C. Bremer, and R. Weissleder, "Fluorescence imaging with near-infrared light : new technological advances that enable in vivo molecular imaging," *European radiology*, vol. 13, pp. 195–208, Jan. 2003.
- [28] E. M. Sevick-Muraca, J. P. Houston, and M. Gurfinkel, "Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents," *Current opinion in chemical biology*, vol. 6, pp. 642–650, Oct. 2002.
- [29] S. A. Hilderbrand and R. Weissleder, "Near-infrared fluorescence : application to in vivo molecular imaging," *Current opinion in chemical biology*, vol. 14, pp. 71–79, Feb. 2010.
- [30] R. Y. Tsien, "Building and breeding molecules to spy on cells and tumors," *FEBS letters*, vol. 579, pp. 927–932, Feb. 2005.
- [31] M. Funovics, R. Weissleder, and C.-H. Tung, "Protease sensors for bioimaging," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 377, pp. 956–963, Nov. 2003.
- [32] R. Weissleder, C.-H. Tung, U. Mahmood, and A. Bogdanov, "In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes," *Nature Biotechnology*, vol. 17, no. 4, pp. 375–378, 1999.
- [33] V. Ntziachristos and R. Weissleder, "Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized born approximation," *Optics Letters*, vol. 26, pp. 893–895, June 2001.

- [34] A. Soubret and V. Ntziachristos, "Fluorescence molecular tomography in the presence of background fluorescence," *Physics in medicine and biology*, vol. 51, pp. 3983–4001, Aug. 2006.
- [35] V. Ntziachristos, C.-H. Tung, C. Bremer, and R. Weissleder, "Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo," *Nature medicine*, vol. 8, pp. 757–760, July 2002.
- [36] R. Cierniak, *X-Ray computed tomography in biomedical engineering*. London ; New York : Springer, 2011.
- [37] D. L. Bailey, *Positron Emission Tomography*. [New York] : Springer-Verlag London Limited, 2005.
- [38] S. Gioux, H. S. Choi, and J. V. Frangioni, "Image-guided surgery using invisible near-infrared light : fundamentals of clinical translation," *Molecular imaging*, vol. 9, pp. 237–255, Oct. 2010.
- [39] C. H. Schmitz, M. Löcker, J. M. Lasker, A. H. Hielscher, and R. L. Barbour, "Instrumentation for fast functional optical tomography," *Review of Scientific Instruments*, vol. 73, pp. 429–439, Feb. 2002.
- [40] E. M. C. Hillman, J. C. Hebden, F. E. W. Schmidt, S. R. Arridge, M. Schweiger, H. Dehghani, and D. T. Delpy, "Calibration techniques and datatype extraction for time-resolved optical tomography," *Review of Scientific Instruments*, vol. 71, pp. 3415–3427, Sept. 2000.
- [41] T. H. Pham, O. Coquoz, J. B. Fishkin, E. Anderson, and B. J. Tromberg, "Broad bandwidth frequency domain instrument for quantitative tissue optical spectroscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 71, pp. 2500–2513, June 2000.
- [42] S. L. Troyan, V. Kianzad, S. L. Gibbs-Strauss, S. Gioux, A. Matsui, R. Oketokoun, L. Ngo, A. Khamene, F. Azar, and J. V. Frangioni, "The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system : a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping," *Annals of surgical oncology*, vol. 16, pp. 2943–2952, Oct. 2009.
- [43] S. Gioux, J.-G. Coutard, M. Berger, H. Grateau, V. Josserand, M. Keramidas, C. Righini, J.-L. Coll, and J.-M. Dinten, "FluoSTIC : miniaturized fluorescence image-guided surgery system," *Journal of biomedical optics*, vol. 17, p. 106014, Oct. 2012.
- [44] E. J. Wood, "Molecular probes : Handbook of fluorescent probes and research chemicals : By r p haugland. pp 390. interchim (molecular probes inc, PO box 22010 eugene, OR 97402-0414, USA, or 15 rue des champs, 92600 asnieres, paris). 1992–1994. \$15," *Biochemical Education*, vol. 22, no. 2, pp. 83–83, 1994.
- [45] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, pp. 751–760, Dec. 2007.
- [46] Z.-H. Jin, V. Josserand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M.-C. Favrot, and J.-L. Coll, "In vivo optical imaging of integrin $\alpha_3\beta_1$ in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors," *Molecular Cancer*, vol. 6, p. 41, June 2007.
- [47] J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, Z.-h. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.-L. Coll, and I. Texier, "Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice," *ChemMedChem*, vol. 1, no. 10, pp. 1069–1072, 2006.

- [48] Y. Urano, D. Asanuma, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, M. Kamiya, T. Nagano, T. Watanabe, A. Hasegawa, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, "Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes," *Nature Medicine*, vol. 15, pp. 104–109, Jan. 2009.
- [49] Y. T. Lim, S. Kim, A. Nakayama, N. E. Stott, M. G. Bawendi, and J. V. Frangioni, "Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging," *Molecular imaging*, vol. 2, pp. 50–64, Jan. 2003.
- [50] G. A. Wagnières, W. M. Star, and B. C. Wilson, "In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications," *Photochemistry and photobiology*, vol. 68, pp. 603–632, Nov. 1998.
- [51] S. Villette, S. Pigaglio-Deshayes, C. Vever-Bizet, P. Validire, and G. Bourg-Heckly, "Ultraviolet-induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantitation of NAD(p)h," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 5, pp. 483–492, May 2006.
- [52] S. G. Demos, R. Gandour-Edwards, R. Ramsamooj, and R. d. White, "Near-infrared autofluorescence imaging for detection of cancer," *Journal of biomedical optics*, vol. 9, pp. 587–592, June 2004.
- [53] S. G. Demos, R. Gandour-Edwards, R. Ramsamooj, and R. deVere White, "Spectroscopic detection of bladder cancer using near-infrared imaging techniques," *Journal of biomedical optics*, vol. 9, pp. 767–771, Aug. 2004.
- [54] X. Han, H. Lui, D. I. McLean, and H. Zeng, "Near-infrared autofluorescence imaging of cutaneous melanins and human skin in vivo," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, no. 2, p. 024017, 2009.
- [55] X. Shao, W. Zheng, and Z. Huang, "In vivo diagnosis of colonic precancer and cancer using near-infrared autofluorescence spectroscopy and biochemical modeling," *Journal of biomedical optics*, vol. 16, p. 067005, June 2011.
- [56] S. MacLaurin, M. Bouchard, P. Dwyer, L. R., J. Mansfield, and T. Krucker, "Reduction of skin and food autofluorescence in different mouse strains through diet changes," *Society for Molecular Imaging, Annual Meeting, Hawaii*, 2006.
- [57] D. Wood, G. Feke, D. Vizard, and R. Papineni, "Refining epifluorescence imaging and analysis with automated multiple-band flat-field correction," *Nature Methods*, vol. 5, Apr. 2008.
- [58] J. R. Mansfield, K. W. Gossage, C. C. Hoyt, and R. M. Levenson, "Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging," *Journal of biomedical optics*, vol. 10, p. 41207, Aug. 2005.
- [59] H. Xu, C. Kuo, and B. Rice, "Improved sensitivity by applying spectral unmixing prior to fluorescent tomography," in *Biomedical Optics*, OSA Technical Digest (CD), p. BMC1, Optical Society of America, Mar. 2008.
- [60] C. H. V. d. Lest, E. M. Versteeg, J. H. Veerkamp, and T. H. V. Kuppevelt, "Elimination of autofluorescence in immunofluorescence microscopy with digital image processing," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 43, pp. 727–730, July 1995.
- [61] T. Troy and B. Rice, "Methods for reducing the effects of background autofluorescence using IVIS imaging technology," tech. rep., 2004.

- [62] W. Wang, S. Demos, J. Ali, G. Zhang, and R. Alfano, "Visibility enhancement of fluorescent objects hidden in animal tissues using spectral fluorescence difference method," *Optics Communications*, vol. 147, pp. 11–15, Feb. 1998.
- [63] M. Neumann and D. Gabel, "Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 50, pp. 437–439, Mar. 2002.
- [64] W. Pham, L. Cassell, A. Gillman, D. Koktysh, and J. C. Gore, "A near-infrared dye for multichannel imaging," *Chemical communications (Cambridge, England)*, pp. 1895–1897, Apr. 2008.
- [65] R. Kumar, T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, S. K. Gupta, C. Borek, M. E. Thompson, and P. N. Prasad, "Near-infrared phosphorescent polymeric nanomicelles : efficient optical probes for tumor imaging and detection," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 1, pp. 1474–1481, July 2009.
- [66] W. Akers, F. Lesage, D. Holten, and S. Achilefu, "In vivo resolution of multiexponential decays of multiple near-infrared molecular probes by fluorescence lifetime-gated whole-body time-resolved diffuse optical imaging," *Molecular imaging*, vol. 6, pp. 237–246, Aug. 2007.
- [67] T. Desmettre, J. M. Devoisselle, and S. Mordon, "Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography," *Survey of ophthalmology*, vol. 45, pp. 15–27, Aug. 2000.
- [68] O. S. o. America, *Handbook of Optics, Volume 1 : Fundamentals, Techniques, and Design. Second Edition*. McGraw-Hill Professional, 2 ed., Sept. 1994.
- [69] R. S. Bradley and M. S. Thorniley, "A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 3, pp. 1–13, Feb. 2006.
- [70] G. Themelis, J. S. Yoo, K.-S. Soh, R. Schulz, and V. Ntziachristos, "Real-time intraoperative fluorescence imaging system using light-absorption correction," *Journal of biomedical optics*, vol. 14, p. 064012, Dec. 2009.
- [71] W.-C. Lin, S. Toms, E. Jansen, and A. Mahadevan-Jansen, "Intraoperative application of optical spectroscopy in the presence of blood," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 7, pp. 996 –1003, Dec. 2001.
- [72] F. F. Jöbbsis, M. O'Connor, A. Vitale, and H. Vreman, "Intracellular redox changes in functioning cerebral cortex. i. metabolic effects of epileptiform activity," *Journal of neurophysiology*, vol. 34, pp. 735–749, Sept. 1971.
- [73] K. Harbig, B. Chance, A. G. Kovách, and M. Reivich, "In vivo measurement of pyridine nucleotide fluorescence from cat brain cortex," *Journal of applied physiology*, vol. 41, pp. 480–488, Oct. 1976.
- [74] R. S. Kramer and R. D. Pearlstein, "Cerebral cortical microfluorometry at isosbestic wavelengths for correction of vascular artifact," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 205, pp. 693–696, Aug. 1979.
- [75] J. M. Coremans, C. Ince, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, "(semi-)quantitative analysis of reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence images of blood-perfused rat heart," *Biophysical journal*, vol. 72, pp. 1849–1860, Apr. 1997.

- [76] T. Wu, J. Qu, T.-H. Cheung, K. Lo, and M.-Y. Yu, "Preliminary study of detecting neoplastic growths in vivo with real time calibrated autofluorescence imaging," *Optics express*, vol. 11, pp. 291–298, Feb. 2003.
- [77] M. Canpolat and J. R. Mourant, "Optical measurement of photosensitizer concentration using a probe with a small source-detector fiber separation," pp. 10–18, May 2000.
- [78] R. Weersink, M. S. Patterson, K. Diamond, S. Silver, and N. Padgett, "Noninvasive measurement of fluorophore concentration in turbid media with a simple fluorescence /reflectance ratio technique," *Applied Optics*, vol. 40, pp. 6389–6395, Dec. 2001.
- [79] S. Avrillier, E. Tinet, D. Ettori, and M. Anidjar, "Laser-induced autofluorescence diagnosis of tumors," *Physica Scripta*, vol. 1997, p. 87, Jan. 1997.
- [80] M. C. Aalders, H. J. Sterenborg, F. A. Stewart, and N. van der Vange, "Photodetection with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in the rat abdominal cavity : drug-dose-dependent fluorescence kinetics," *Photochemistry and photobiology*, vol. 72, pp. 521–525, Oct. 2000.
- [81] B. Pogue and T. Hasan, "Fluorophore quantitation in tissue-simulating media with confocal detection," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 2, pp. 959–964, Dec. 1996.
- [82] B. W. Pogue and G. Burke, "Fiber-optic bundle design for quantitative fluorescence measurement from tissue," *Applied Optics*, vol. 37, pp. 7429–7436, Nov. 1998.
- [83] N. Biswal, S. Gupta, N. Ghosh, and A. Pradhan, "Recovery of turbidity free fluorescence from measured fluorescence : an experimental approach," *Optics express*, vol. 11, pp. 3320–3331, Dec. 2003.
- [84] R. Richards-Kortum, R. Rava, M. Fitzmaurice, L. Tong, N. Ratliff, J. Kramer, and M. Feld, "A one-layer model of laser-induced fluorescence for diagnosis of disease in human tissue : applications to atherosclerosis," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 36, pp. 1222–1232, Dec. 1989.
- [85] A. J. Durkin, S. Jaikumar, N. Ramanujam, and R. Richards-Kortum, "Relation between fluorescence spectra of dilute and turbid samples," *Applied Optics*, vol. 33, pp. 414–423, Jan. 1994.
- [86] N. N. Zhadin and R. R. Alfano, "Correction of the internal absorption effect in fluorescence emission and excitation spectra from absorbing and highly scattering media : theory and experiment," *Journal of biomedical optics*, vol. 3, pp. 171–186, Apr. 1998.
- [87] K. R. Diamond, T. J. Farrell, and M. S. Patterson, "Measurement of fluorophore concentrations and fluorescence quantum yield in tissue-simulating phantoms using three diffusion models of steady-state spatially resolved fluorescence," *Physics in medicine and biology*, vol. 48, pp. 4135–4149, Dec. 2003.
- [88] H. Dehghani, M. E. Eames, P. K. Yalavarthy, S. C. Davis, S. Srinivasan, C. M. Carpenter, B. W. Pogue, and K. D. Paulsen, "Near infrared optical tomography using NIRFAST : Algorithm for numerical model and image reconstruction," *Communications in numerical methods in engineering*, vol. 25, pp. 711–732, Aug. 2008.
- [89] M. Jermyn, H. Ghadyani, M. A. Mastanduno, W. Turner, S. C. Davis, H. Dehghani, and B. W. Pogue, "Fast segmentation and high-quality three-dimensional volume mesh creation from medical images for diffuse optical tomography," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 18, no. 8, pp. 086007–086007, 2013.

- [90] T. Durduran, R. Choe, W. B. Baker, and A. G. Yodh, "Diffuse optics for tissue monitoring and tomography," *Reports on Progress in Physics*, vol. 73, p. 076701, July 2010.
- [91] M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope," *Optics Letters*, vol. 22, pp. 1905–1907, Dec. 1997.
- [92] M. G. L. Gustafsson, "Nonlinear structured-illumination microscopy : Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 13081–13086, Sept. 2005.
- [93] F. Chasles, B. Dubertret, and A. C. Boccara, "Optimization and characterization of a structured illumination microscope," *Optics Express*, vol. 15, pp. 16130–16140, Nov. 2007.
- [94] E. Mudry, K. Belkebir, J. Girard, J. Savatier, E. L. Moal, C. Nicoletti, M. Allain, and A. Sentenac, "Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns," *Nature Photonics*, vol. 6, pp. 312–315, May 2012.
- [95] A. J. Lin, M. A. Koike, K. N. Green, J. G. Kim, A. Mazhar, T. B. Rice, F. M. LaFerla, and B. J. Tromberg, "Spatial frequency domain imaging of intrinsic optical property contrast in a mouse model of alzheimer's disease," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 39, pp. 1349–1357, Apr. 2011.
- [96] A. Mazhar, D. J. Cuccia, S. Gioux, A. J. Durkin, J. V. Frangioni, and B. J. Tromberg, "Structured illumination enhances resolution and contrast in thick tissue fluorescence imaging," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 1, 2010.
- [97] S. D. Konecky, A. Mazhar, D. Cuccia, A. J. Durkin, J. C. Schotland, and B. J. Tromberg, "Quantitative optical tomography of sub-surface heterogeneities using spatially modulated structured light," *Optics express*, vol. 17, pp. 14780–14790, Aug. 2009.
- [98] B. W. Pogue and M. S. Patterson, "Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry," *Journal of biomedical optics*, vol. 11, p. 041102, Aug. 2006.
- [99] I. Driver, J. W. Feather, P. R. King, and J. B. Dawson, "The optical properties of aqueous suspensions of intralipid, a fat emulsion," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 34, p. 1927, Dec. 1989.
- [100] H. J. van Staveren, C. J. M. Moes, J. van Marie, S. A. Prahl, and M. J. C. van Gemert, "Light scattering in intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm," *Applied Optics*, vol. 30, pp. 4507–4514, Nov. 1991.
- [101] S. T. Flock, S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star, and M. J. van Gemert, "Optical properties of intralipid : a phantom medium for light propagation studies," *Lasers in surgery and medicine*, vol. 12, no. 5, pp. 510–519, 1992.
- [102] J. Swartling, J. S. Dam, and S. Andersson-Engels, "Comparison of spatially and temporally resolved diffuse-reflectance measurement systems for determination of biomedical optical properties," *Applied Optics*, vol. 42, pp. 4612–4620, Aug. 2003.
- [103] A. Pifferi, A. Torricelli, A. Bassi, P. Taroni, R. Cubeddu, H. Wabnitz, D. Grosenick, M. Muller, R. Macdonald, J. Swartling, T. Svensson, S. Andersson-Engels, R. L. P. van Veen, H. J. C. M. Sterenborg, J.-M. Tualle, H. L. Nghiem, S. Avrillier, M. Whelan, and

- H. Stamm, "Performance assessment of photon migration instruments : the MEDPHOT protocol," *Applied Optics*, vol. 44, pp. 2104–2114, Apr. 2005.
- [104] C. Zint, *Tomographie optique proche infrarouge, résolue en temps, des milieux diffusants*. PhD thesis, Université Louis Pasteur, 2002.
- [105] B. Montcel, *Tomographie optique diffuse résolue en temps : Applications fonctionnelles en neurosciences*. PhD thesis, Université Louis Pasteur, 2005.
- [106] A. M. De Grand, S. J. Lomnes, D. S. Lee, M. Pietrzykowski, S. Ohnishi, T. G. Morgan, A. Gogbashian, R. G. Laurence, and J. V. Frangioni, "Tissue-like phantoms for near-infrared fluorescence imaging system assessment and the training of surgeons," *Journal of biomedical optics*, vol. 11, no. 1, p. 014007, 2006.
- [107] F. P. Navarro, M. Berger, M. Goutayer, S. Guillermet, V. Josserand, P. Rizo, F. Vinet, and I. Texier, "A novel indocyanine green nanoparticle probe for non invasive fluorescence imaging in vivo," pp. 71900L–71900L–10, SPIE, 2009.
- [108] J. Gravier, F. P. Navarro, T. Delmas, F. Mittler, A.-C. Couffin, F. Vinet, and I. Texier, "Lipidots : competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, no. 9, pp. 096013–096013–10, 2011.
- [109] J. Mérian, J. Gravier, F. Navarro, and I. Texier, "Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging : From preclinical validations to clinical translation," *Molecules*, vol. 17, pp. 5564–5591, May 2012.
- [110] G. J. Brakenhoff and K. Visscher, "Confocal imaging with bilateral scanning and array detectors," *Journal of Microscopy*, vol. 165, no. 1, pp. 139–146, 1992.
- [111] C. A. DiMarzio and M. Niedre, "Pre-clinical optical molecular imaging in the lung : technological challenges and future prospects," *Journal of Thoracic Disease*, vol. 4, pp. 556–557, Dec. 2012.
- [112] N. H. Asmar, *Partial differential equations with Fourier series and boundary value problems*. Upper Saddle River, N. j. : Pearson Prentice Hall, 2005.
- [113] J. W. Brown and R. V. Churchill, *Fourier series and boundary value problems*. New York : McGraw-Hill, 2012.
- [114] S. L. Jacques, "Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues," *Photochemistry and photobiology*, vol. 67, pp. 23–32, Jan. 1998.

Annexes

A Détails des calculs des solutions de l'approximation de la diffusion en géométries planaires et cylindriques

A.1 Géométrie planaire

Les géométries étudiées sont visibles sur la figure 2.7.

Pour le cas de l'illumination homogène, en régime stationnaire et pour un milieu homogène infini, l'équation de la diffusion d'origine est modifiée et s'écrit en prenant en compte l'invariance par translation

$$\frac{\partial^2 \phi(z)}{\partial z^2} - k^2 \phi(z) = \frac{S_0 \delta(z)}{D} \quad (3)$$

En prenant la solution de l'équation homogène, on trouve que

$$\phi(r) = Ae^{-kz} + Be^{kz} \quad (4)$$

On utilise ensuite le fait que la fonction $\phi(z)$ est bornée. Avec la condition aux limites en 0 on a alors

$$B = 0 \quad (5)$$

$$A = \phi(0) = \frac{S_0}{D} \quad (6)$$

$$\phi(z) = \frac{S_0}{D} e^{-kz} \quad (7)$$

On a là la solution de l'équation de la diffusion en régime stationnaire dans un milieu homogène infini pour une illumination uniforme.

A.2 Géométrie cylindrique

Pour obtenir la solution pour une illumination ligne^[112, 113, 114], on va intégrer l'approximation de la diffusion sur un disque de rayon R

$$2\pi R \frac{\partial \phi(R)}{\partial R} - 2\pi k^2 \int_0^R \phi(r) r dr = \frac{S_0}{D} \quad (8)$$

Si l'on dérive cette équation par rapport à R , on a alors

$$R \frac{\partial^2 \phi(R)}{\partial R^2} + \frac{\partial \phi(R)}{\partial R} - k^2 \phi(R) R = 0 \quad (9)$$

En multipliant cette équation par R , on a alors une équation de Bessel d'ordre 0

$$R^2 \phi''(R) + R \phi'(R) - k^2 R^2 \phi(R) = 0 \quad (10)$$

La solution de cette équation est de la forme

$$y = r^p \sum_{i=0}^{\infty} a_i r^i = \sum_{i=0}^{\infty} a_i r^{p+i} \quad (11)$$

où p est choisi de manière à ce que a_0 soit le premier terme non nul de la série.

En substituant cette série dans l'équation précédente, on obtient

$$\sum_{i=0}^{\infty} [r^2 a_i (p+i)(p+i-1) r^{p+i-2} + r a_i (p+i) r^{p+i-1} - k^2 r^2 a_i r^{p+i}] = 0 \quad (12)$$

$$\sum_{i=0}^{\infty} [(p+i)(p+i-1) + (p+i) - k^2 r^2] a_i r^{p+i} = 0 \quad (13)$$

$$\sum_{i=0}^{\infty} (p+i)^2 a_i r^{p+i} - \sum_{i=0}^{\infty} k^2 a_i r^{p+i+2} = 0 \quad (14)$$

En divisant cette dernière équation par r^p et en faisant le changement de variable $i = i - 2$ dans la deuxième série, on obtient

$$\sum_{i=0}^{\infty} (p+i)^2 a_i r^i - \sum_{i=2}^{\infty} k^2 a_{i-2} r^i = 0 \quad (15)$$

$$p^2 a_0 + (p+1)^2 a_1 r + \sum_{i=2}^{\infty} [(p+i)^2 a_i - k^2 a_{i-2}] r^i = 0 \quad (16)$$

Pour que cette équation soit valable pour tout r , chaque coefficient doit s'annuler en 0.

Pour le coefficient d'ordre 0, cela implique que $p = 0$ ou $a_0 = 0$. Pour celui d'ordre 1, cela implique $p+1 = 0$ ou $a_1 = 0$. On choisit a_0 non nul, ce qui entraîne $p = 0$ et $a_1 = 0$.

L'annulation du terme d'ordre i implique que

$$a_i = \frac{k^2 a_{i-2}}{(p+i)^2} = \left(\frac{k}{i}\right)^2 a_{i-2} \quad (17)$$

Comme $a_1 = 0$, tous les termes d'ordre impair sont alors nuls.

En posant $i = 2j$, on obtient la relation de récurrence suivante

$$a_{2j} = \left(\frac{k}{2j}\right)^2 a_{2j-2}, j = 1, 2, 3... \quad (18)$$

On a donc

$$a_2 = \left(\frac{k}{2}\right)^2 a_0 \quad (19)$$

$$a_4 = \left(\frac{k}{4}\right)^2 a_2 = \frac{k^{2 \times 2}}{(2^2(1 \times 2))^2} a_0 \quad (20)$$

$$a_6 = \left(\frac{k}{6}\right)^2 a_4 = \frac{k^{2 \times 3}}{(2^3(1 \times 2 \times 3))^2} a_0 \quad (21)$$

et donc

$$a_{2j} = \frac{k^{2j}}{(2^j j!)^2} a_0 \quad (22)$$

Comme l'équation de départ est homogène et que chaque coefficient est proportionnel à a_0 , on choisit $a_0 = 1$ ce qui entraîne

$$a_{2j} = \frac{k^{2j}}{(2^j j!)^2} \quad (23)$$

$$y(r) = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{k^{2j}}{(2^j j!)^2} r^{2j} = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{1}{(2^j j!)^2} (kr)^{2j} = K_0(kr) \quad (24)$$

et donc

$$\phi(r) = \frac{S_0 K_0(kr)}{2\pi D} \quad (25)$$

où $K_0(x)$ est la fonction de Bessel modifiée de deuxième espèce à l'ordre 0.

B Liste des publications et communications

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse ont fait l'objet de publications, et ont été présentés à plusieurs congrès nationaux et internationaux. Nous détaillons nos différentes contributions dans les paragraphes suivants.

B.1 Revues à comité de lecture

1. "Laser line scanning for fluorescence reflectance imaging : a phantom study and in vivo validation of the enhancement of contrast and resolution", **Frédéric Fantoni**, Lionel Hervé, Vincent Poher, Sylvain Gioux, Jérôme I. Mars, Jean-Marc Dinten, *Journal of Biomedical Optics*, accepté le 03/09/14, à paraître
2. "Depth-Enhanced Fluorescence Imaging using Masked Detection of Structured Illumination", Joseph Angelo, Vivek Venugopal, **Frédéric Fantoni**, Vincent Poher, Irving Bigio, Lionel Herve, Jean-Marc Dinten, Sylvain Gioux, *Journal of Biomedical Optics*, soumis le 11/09/14

B.2 Congrès internationaux

1. "Background fluorescence reduction and absorption correction for fluorescence reflectance imaging", **Frédéric Fantoni**, Lionel Hervé, Vincent Poher, Sylvain Gioux, Jérôme I. Mars, Jean-Marc Dinten, *Proc. to BIOS congress Vol. 8935, SPIE Photonics West*, San Francisco, USA, February 2014
2. "Laser line scanning illumination scheme for the enhancement of contrast and resolution for fluorescence reflectance imaging", **Frédéric Fantoni**, Lionel Hervé, Vincent Poher, Sylvain Gioux, Jérôme I. Mars, Jean-Marc Dinten, *Proc. to BIOS congress Vol. 8572, SPIE Photonics West*, San Francisco, USA, February 2013

B.3 Congrès nationaux

1. "Techniques d'illumination et de détection innovantes pour l'amélioration du contraste et de la résolution en imagerie moléculaire de fluorescence en rétrodiffusion", **Frédéric Fantoni**, Lionel Hervé, Vincent Poher, Sylvain Gioux, Jérôme I. Mars, Jean-Marc Dinten, *Conférence OptDiag 2014*, Paris, Mai 2014

Résumé — Depuis quelques années, les techniques d'imagerie de fluorescence font l'objet d'une attention particulière, celles-ci permettant d'étudier de manière non invasive un nombre important de processus cellulaires. En particulier, les techniques de fluorescence en rétrodiffusion (FRI pour *Fluorescence Reflectance Imaging*) présentent plusieurs avantages en termes de facilité de mise en œuvre, de rapidité et de coût, mais elles sont aussi sujettes à des limites fortes : la pénétration des tissus reste relativement faible (quelques millimètres seulement), et il est impossible d'avoir une information quantitative du fait de la diffusion des photons.

L'objectif de cette thèse a été de réduire les effets des signaux parasites afin d'améliorer les performances de la FRI aussi bien au niveau du contraste que de la résolution. Pour ce faire nous avons décidé d'utiliser de nouvelles techniques d'illumination et de détection. Contrairement aux systèmes classiques qui utilisent une illumination et une détection large champ, nous balayons l'objet d'étude avec une ligne laser, des images étant acquises à chaque position de la ligne. On a alors accès à une pile d'images contenant un nombre d'informations bien plus important que dans le cas classique.

Trois axes ont été suivis pour l'exploitation de ces informations. Les méthodes développées ont été testées en simulation avec le logiciel NIRFAST et un algorithme de Monte-Carlo mais aussi expérimentalement. Les validations expérimentales ont été réalisées sur fantômes optiques et en *in vivo* sur petit animal en les comparant à une illumination uniforme plus classique. En améliorant à la fois le contraste et la résolution, ces différentes méthodes nous permettent d'obtenir de l'information exploitable plus loin en profondeur en réduisant les effets néfastes des signaux parasites et de la diffusion.

Mots clés : Imagerie moléculaire de fluorescence, Systèmes d'imagerie, Techniques d'illumination et de détection, Techniques de reconstruction d'images.

Abstract — Intraoperative fluorescence imaging in reflectance geometry is an attractive imaging modality to noninvasively monitor fluorescence-targeted tumors. However, in some situations, this kind of imaging suffers from a lack of depth penetration and a poor resolution due to the diffusive nature of photons in tissue.

The objective of the thesis was to tackle these limitations. Rather than using a wide-field illumination like usual systems, the technique developed relies on the scanning of the medium with a laser line illumination and the acquisition of images at each position of excitation. Several detection schemes are proposed to take advantage of the stack of images acquired to enhance the resolution and the contrast of the final image.

These detection techniques were tested both in simulation with the NIRFAST software and a Monte-Carlo algorithm and experimentally. The experimental validation was performed on tissue-like phantoms and *in vivo* with a preliminary testing. The results are compared to those obtained with a classical wide-field illumination. As they enhance both the contrast and the resolution, these methods allow us to image deeper targets by reducing the negative effects of parasite signals and diffusion.

Keywords : Fluorescence molecular imaging, Imaging systems, Illumination design, Image reconstruction techniques.

Laboratoire Grenoble Image Parole Signal et Automatique
Département des Images et des Signaux
11 rue des Mathématiques, Domaine Universitaire, BP 46,
38402 St-Martin-d'Hères Cedex, France.

—
Laboratoire Imagerie et Systèmes d'Acquisition
CEA-LETI
17 rue des Martyrs
38054 Grenoble Cedex 9, France.